

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Biosyntéza a percepce cytokininů v topolu

### DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: **Mgr. Pavel Jaworek**  
Studijní program: P1416 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.**  
Konzultant: **Mgr. David Kopečný, Ph.D.**  
Rok: 2019

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním disertační práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 11.11.2019

.....  
Mgr. Pavel Jaworek

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji svému školiteli Petru Tarkowskému a konzultantovi Davidu Kopečnému za odborné vedení mé disertační práce, pomoc s navrhováním experimentů a diskutování výsledků. Dále bych chtěl poděkovat svým kolegům z Oddělení proteomiky, zejména Radce Končitíkové a Marku Šebelovi, za cenné rady a přátelské prostředí na pracovišti. Děkuji také své rodině a přátelům za jejich dlouhodobou podporu.

Experimentální část práce byla realizována na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a na Oddělení fytochemie a Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum. Finanční podporu zajistil grant GA15-16888S Grantové agentury České republiky – Aromatické a isoprenoidní cytokininy v topolu: biosyntéza a percepce.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Pavel Jaworek
Název práce	Biosyntéza a percepce cytokininů v topolu
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Cytokinininy jsou skupinou fytohormonů klíčovou pro regulaci růstu a vývoje rostlin. Podle charakteru postranního řetězce, vázaného na exocyklický dusík adeninu, se dělí na isoprenoidní a vzácněji se vyskytující aromatické. Jako modelový organismus pro studium metabolismu a percepce aromatických cytokininů vybrán *Populus × canadensis* cv. *Robusta*. Tento topol obsahuje *ortho*-topolin a jeho ribosid, který je zároveň vázán v tRNA. Podařilo se klonovat geny všech devíti topolových isopentenyltransferas (*PcIPT*), které kódují enzymy katalyzující první krok biosyntézy isoprenoidních cytokininů, a také všech pěti histidinkinových receptorů cytokininů (*PcHK*). Jejich genová exprese byla napříč orgány topolu analyzována pomocí kvantitativní PCR. Funkčnost většiny *PcIPT in vivo* byla prokázána indukovatelnou expresí příslušných genů v *Arabidopsis thaliana*. Transgenní linie produkovaly značná množství metabolitů isopentenyladeninu a *trans*-zeatinu, ale u některých byly překvapivě zaznamenány i zvýšené hladiny cytokininů *cis*-zeatinového typu. *PcHK* byly exprimovány v *Escherichia coli*, navazující „live cell binding assay“ umožnila stanovit ligandovou specifitu a pH optimum všech pěti rekombinantních proteinů. Většinu cytokininů během kompetičních testů vázala nejsilněji *PcHK2*. Dále byla ověřena kinasová aktivita receptorů, největší míru aktivace po vazbě ligandu vykazovala *PcHK4a*. Kvantifikací cytokininů před a po inkubaci s bakteriální kulturou bylo potvrzeno, že isopentenyladenosin je skutečný ligand topolových receptorů.

Klíčová slova	Aromatické cytokinininy, histidinkinasa, isopentenyltransferasa, topol, tRNA
Počet stran	95
Počet příloh	2
Jazyk	Český

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Pavel Jaworek
Title	Biosynthesis and perception of cytokinins in poplar
Type of thesis	Dissertation
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2020

### Abstract

Cytokinins are phytohormones with a key role in the regulation of plant growth and development. They are divided into isoprenoid or aromatic group according to the nature of side chain bound to the exocyclic nitrogen atom of adenine. In this work, *Populus × canadensis* cv. *Robusta* was chosen as a model organism to study metabolism and perception of aromatic cytokinins as it contains *ortho*-topolin and its riboside, also bound in the poplar tRNA. All nine poplar isopentenyl transferase genes (*PcIPT*), coding enzymes fundamental for isoprenoid cytokinin biosynthesis, as well as all five cytokinin receptors histidine kinase genes (*PcHK*) were cloned. The levels of gene expression were analyzed using quantitative PCR across various poplar organs. The majority of *PcIPT*s was proved to be functional *in vivo* after their inducible expression in *Arabidopsis thaliana*. These transgenic lines produced substantial amounts of *trans*-zeatin and isopentenyl adenine metabolites. Surprisingly, levels of *cis*-zeatin type cytokinins were also elevated in some cases. *PcHK* were functionally expressed in *Escherichia coli* to perform live cell binding assay for determination of receptors ligand specificities and pH optima. The majority of cytokinins exhibited the strongest binding to *PcHK2*. Additionally, kinase activities of the receptors were verified, *PcHK4a* displayed the highest activation by ligand binding. The quantification of cytokinins before and after their incubation with bacterial cultures proved that isopentenyl adenosine is a true ligand of poplar receptors.

Keywords	Aromatic cytokinins, histidine kinase, isopentenyl transferase, poplar, tRNA
Number of pages	95
Number of appendices	2
Language	Czech

<b>OBSAH</b>		
<b>1</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Úvod</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>4</b>
3.1	Struktura a výskyt cytokininů	4
3.2	Biosyntéza a interkonverze isoprenoidních cytokininů	7
3.3	Degradace a inaktivace cytokininů	13
3.4	Transport cytokininů	16
3.5	Cytokininové receptory a signalizace	20
3.6	Fyziologické funkce cytokininů	28
<b>4</b>	<b>Seznam publikací</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>34</b>
5.1	Biologický materiál	34
5.2	Metody	36
<b>6</b>	<b>Výsledky</b>	<b>43</b>
6.1	Výběr modelového organismu pro studium aromatických cytokininů	43
6.2	Charakterizace topolových isopentenyltransferas	49
6.3	Charakterizace cytokininových receptorů z topolu	60
<b>7</b>	<b>Diskuze</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Závěr</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Literatura</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>Přílohy</b>	<b>95</b>

## 1 CÍLE PRÁCE

- Shrnutí aktuálních poznatků o výskytu, metabolismu, percepci a fyziologických funkcích cytokininů v rostlinách.
- Pilotní experimenty – selekce vhodného modelového organismu, odvození a charakterizace *in vitro* kultury topolu *Populus × canadensis* cv. *Robusta*.
- Molekulární klonování genů kódujících isopentenyltransferasy z *P. × canadensis* (*PcIPT*) a analýza jejich genové exprese.
- Heterologní exprese *PcIPT* v *Escherichia coli* a *Arabidopsis thaliana*, charakterizace rekombinantních *PcIPT*.
- Molekulární klonování genů kódujících histidinkinasové cytokininové receptory z *P. × canadensis* (*PcHK*) a analýza jejich genové exprese.
- Heterologní exprese *PcHK* v *E. coli* a charakterizace rekombinantních *PcHK*.

## 2 ÚVOD

Cytokininy jsou hormony významně se podílející na regulaci vývoje a růstu rostlin. S výjimkou některých syntetických derivátů močoviny jsou všechny známé látky s cytokininovou aktivitou deriváty adeninu nesoucí isoprenoidní nebo aromatický substituent v poloze  $N^6$ . U bakterií a eukaryotních organismů jsou navíc isoprenylované adeninové báze součástí některých populací tRNA a podílí se na stabilizaci interakce kodon-antikodon (Persson et al. 1994).

Zatímco biosyntéza vzácněji se vyskytujících aromatických cytokininů zůstává neobjasněná, u isoprenoidních je již dobře prostudována spolu s jejich navazujícím metabolismem. Isopentenyltransferasy (IPT) umožňují připojení postranního řetězce k adeninovým nukleotidům. Vzniklé meziproducty jsou následně hydroxylovány nebo jsou z nich působením specifické ribohydrolasy uvolněny aktivní cytokininové báze. Ty mohou být dále konjugovány, nejčastěji se sacharidy, nebo odbourány cytokinindehydrogenasou (CKX) (Frébort et al. 2011).

Percepci cytokininů zajišťují histidinkinasové receptory (HK) většinou ukotvené v membráně. Signál je dále přenášen fosforylační kaskádou až na skupinu transkripčních regulátorů, které ovlivňují expresi cílových genů (Kieber a Schaller, 2018). Prostřednictvím této signalizace pak cytokininy společně s auxiny indukují buněčné dělení, a zásadním způsobem ovlivňují buněčnou diferenciaci a morfogenezi (Chandler a Werr, 2015). Mezi další významné procesy, na jejichž regulaci se cytokininy podílí, patří například senescence listů, asimilace minerálních látek a mobilizace živin, reakce na světelné podmínky a stres nebo interakce s patogeny (Werner a Schmölling 2009).

Kromě rostlin se cytokininy vyskytují u některých druhů hub (Vrabka et al. 2019), sinic, bakterií, na rostlinách parazitujícího hmyzu nebo u hlístic. Byly detekovány také volně v prostředí, zejména ve vodě nebo půdě (Stirk a Staden, 2010). Zatím není zcela jasné, zda jsou některými z těchto organismů vylučovány cíleně pro signalizaci napříč ekosystémem (Robischon 2015). Tato disertační práce je však věnována cytokininům v topolu *Populus* × *canadensis* cv. *Robusta*, který byl jako modelový organismus vybrán na základě literatury a pilotních experimentů. Původním záměrem bylo objasnit biosyntézu aromatických cytokininů, které byly v *P. × canadensis* poprvé detekovány jako přirozeně se vyskytující látky (Horgan et al. 1973). Složitost této problematiky však přesáhla časové možnosti



i materiální prostředky dostupné během mého studia. Z tohoto důvodu bylo směřování práce a její cíle změněny na studium biosyntézy a percepce cytokininů v *P. × canadensis* obecně.

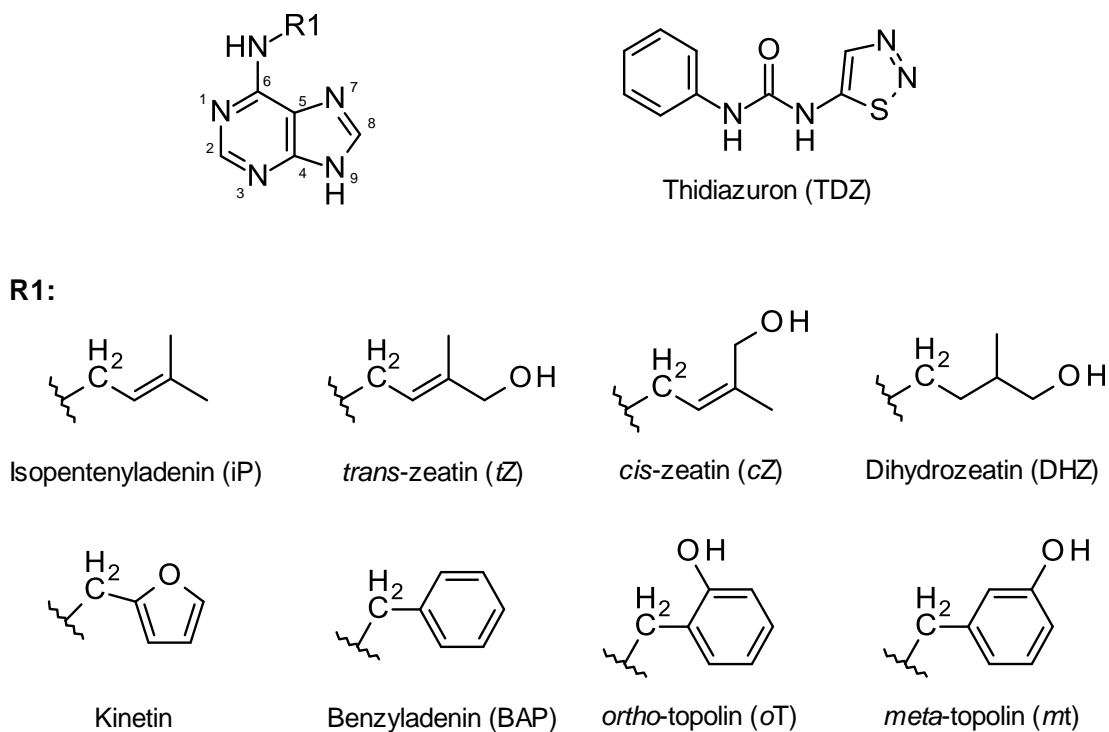
Disertační práce obsahuje výsledky pilotních experimentů, které předcházely plánovanému avšak nerealizovanému využití tritium značených látek pro nalezení biosyntetických prekurzorů aromatických cytokininů. Experimentální část dále popisuje výsledky, které byly publikovány v mezinárodním časopise *Planta* jako součást dvou příložených prvoautorských článků. První z nich je věnován především klonování, purifikaci rekombinantních topolových IPT a jejich indukovatelné expresi v *Arabidopsis thaliana*. Druhý článek zahrnuje klonování a charakterizaci cytokininových receptorů z topolu. Veškerá data jsou na závěr diskutována a uvedena do kontextu aktuálních vědeckých poznatků.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Struktura a výskyt cytokininů

Hledání látky použitelné pro stimulaci buněčného dělení v rostlinných *in vitro* kulturách vedlo v 50. letech minulého století k objevu  $N^6$ -furfuryladeninu, známého jako kinetin (Obr. 1), který byl izolován z autoklávované DNA (Miller et al. 1955, 1956). Trvalo však ještě 40 let, než se podařilo prokázat jeho přirozený výskyt v rostlinném materiálu (Barciszewski et al. 1996). Spolu s kinetinem byly ve stejném roce podobné vlastnosti popsány u 1,3-difenylnmočoviny (Shantz a Steward, 1955). Později se však ukázalo, že se jedná o čistě syntetickou látku, kterou byl původní zdrojový materiál kontaminován (Amasino 2005). Nicméně disubstituované deriváty močoviny, například vysoce aktivní thidiazuron (TDZ; Obr. 1), se využívají dodnes (Mok et al. 1982; Yamada et al. 2001). Souhrnně se této skupině látek schopných indukovat dělení rostlinných buněk (cytokinezi) říkalo kininy. Název byl ale později změněn na cytokininy, aby nedocházelo k jejich záměně za polypeptidy známé z fyziologie živočichů (Skoog et al. 1965).

Všechny přirozeně se vyskytující cytokininy jsou  $N^6$ - substituované deriváty adeninu. U vyšších rostlin se všudypřítomně vyskytují cytokininy s isoprenoidním postranním řetězcem, aromatické cytokininy jsou naopak poměrně vzácné. Prvním (isoprenoidním) cytokininem izolovaným z rostlinného materiálu – z nezralých obilek kukuřice (*Zea mays*), podle které byl pojmenován – byl *trans*-zeatin (*tZ*; Obr. 1) (Letham, 1963). Strukturně se jedná o *trans*- isomer 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-adeninu (Letham et al. 1964) a v kukuřici byl nalezen také ve formě ribosidu a nukleotidu (Miller 1965). Dalším objeveným cytokininem byl  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)-adenin (iP) produkovaný patogenní bakterií *Rhodococcus fascians* (Klāmbt et al. 1966), která pomocí iP stimuluje tvorbu hálek. Ze směsi malých RNA špenátu a hrachu se také podařilo izolovat *cis*-zeatin (*cZ*), respektive jeho ribosid (Hall et al. 1967) a ze semen lupiny žluté dihydrozeatin (DHZ) (Koshimizu et al. 1967). Z obou zeatinových isomerů je *tZ* biologicky podstatně aktivnější (Spíchal et al. 2004; Romanov et al. 2006) a společně s iP je dlouhodobě považován ze převládající typ cytokininů (Frébort et al. 2011). Nicméně *cZ*-typ je také vysoce abundantní, v některých rostlinách (řády liliotvaré, hvězdicotvaré nebo čeled' lipnicovitě) a v určitých vývojových stádiích (například semena nebo senescentní listy) dokonce převažuje (Gajdošová et al. 2011).



**Obrázek 1** Strukturní vzorce, názvy a zkratky cytokininových bází a syntetického thidiazuronu.

Kromě cytokininových bází se v rostlinách vyskytuje celá řada jejich konjugátů se sacharidy a dalších derivátů. Nejvýznamnější jsou cytokininové ribosidy (v poloze  $N^9$ ), považované za hlavní transportní formu prostřednictvím cévních svazků, a nuklotidy, které jsou primárním produktem biosyntézy isoprenoidních cytokininů (Sakakibara 2006). Běžně se také vyskytují *N*-glukosidy na adeninové bázi v polohách  $N^3$ ,  $N^7$  a  $N^9$  nebo *O*-glukosidy na hydroxylové skupině postranního řetězce, je-li přítomna. *O*-glukosidy pravděpodobně slouží jako pohotovostní zásobní forma cytokininů, jelikož glukosa z nich může být rychle odštěpena. *N*-glykosylace je naopak považována za ireversibilní (Brzobohatý et al. 1993). Z embryí fazolu byly izolovány také *O*-xylosidy (Turner et al. 1987), ale jsou popsány i komplexnější konjugáty jako například disacharidy z borovice (Taylor et al. 1984) a petúnie (Auer a Cohen, 1993) nebo *O*-oligosacharid z kokosového mléka (Kobayashi et al. 1997).

Pozoruhodné jsou 2-methylthio-deriváty isoprenoidních cytokininů, které byly původně identifikovány ve formě ribosidů jako součást tRNA klíčků pšenice (Burrows et al. 1970) nebo špenátových listů (Vreman et al. 1978). Jsou produkovány také například bakterií

*R. fascians*, u které je 2-methylthio-*cZ* podstatný pro patogenezi (Pertry et al. 2009), nebo sinicemi rodu *Nostoc* (Frébortová et al. 2017). Dalším méně obvyklým derivátem je například zeatin s alaninem vázaným v poloze  $N^9$  nazývaný kyselina lupinová (Entsch et al. 1983). V lupině byly dále objeveny *O*-acetyl deriváty zeatinových nukleotidů (Letham a Zhang, 1989), které jsou ve formě volných bází nebo ribosidů produkovány také v cibulkách narcisu při ochlazení (Letham et al. 2003).

Mezi cytokininy s aromatickým postranním řetězcem patří  $N^6$ -benzyladenin (BAP) a jeho hydroxylované deriváty *ortho*- a *meta*-topolin (*oT* a *mT*; Obr. 1). Dlouhou dobu byly považovány za syntetické látky, ale mnoho jejich derivátů bylo později detekováno v listech topolu druhu *P. × canadensis*, což se odráží v triviálním názvu „topolin“ (Strnad et al. 1997). Jako první byl identifikován ribosid *oT* (*oTR*; Horgan et al., 1973), který byl izolován také z kaly (Chaves das Neves a Pais, 1980a) spolu s 2-methylthio-*oT*-9-glukosidem (Chaves Das Neves a Pais, 1980b). Následovala izolace BAP, jeho ribosidu, nukleotidu (Nandi et al., 1989a) a 9-glukosidu (Nandi et al. 1989b) z hálek („crown gall“) na rajčeti. Skupina profesora Strnada z listů *P. × canadensis* dále izolovala *oT* (Strnad et al. 1992) a *oT*-9-glukosid (Strnad et al. 1994), *mT*, jeho ribosid a 9-glukosid (Strnad et al. 1997). V buněčné suspenzní kultuře *Chenopodium rubrum* byl také identifikován *oT*-*O*-glukosid spolu s jeho 2-methylthio-derivátem (Doležal et al. 2002). V *P. × canadensis*, *Arabidopsis thaliana* a některých kmenech *Agrobacterium tumefaciens* se podařilo identifikovat methoxy-deriváty *oT*, *mT* a příslušných ribosidů (Tarkowská et al. 2003).

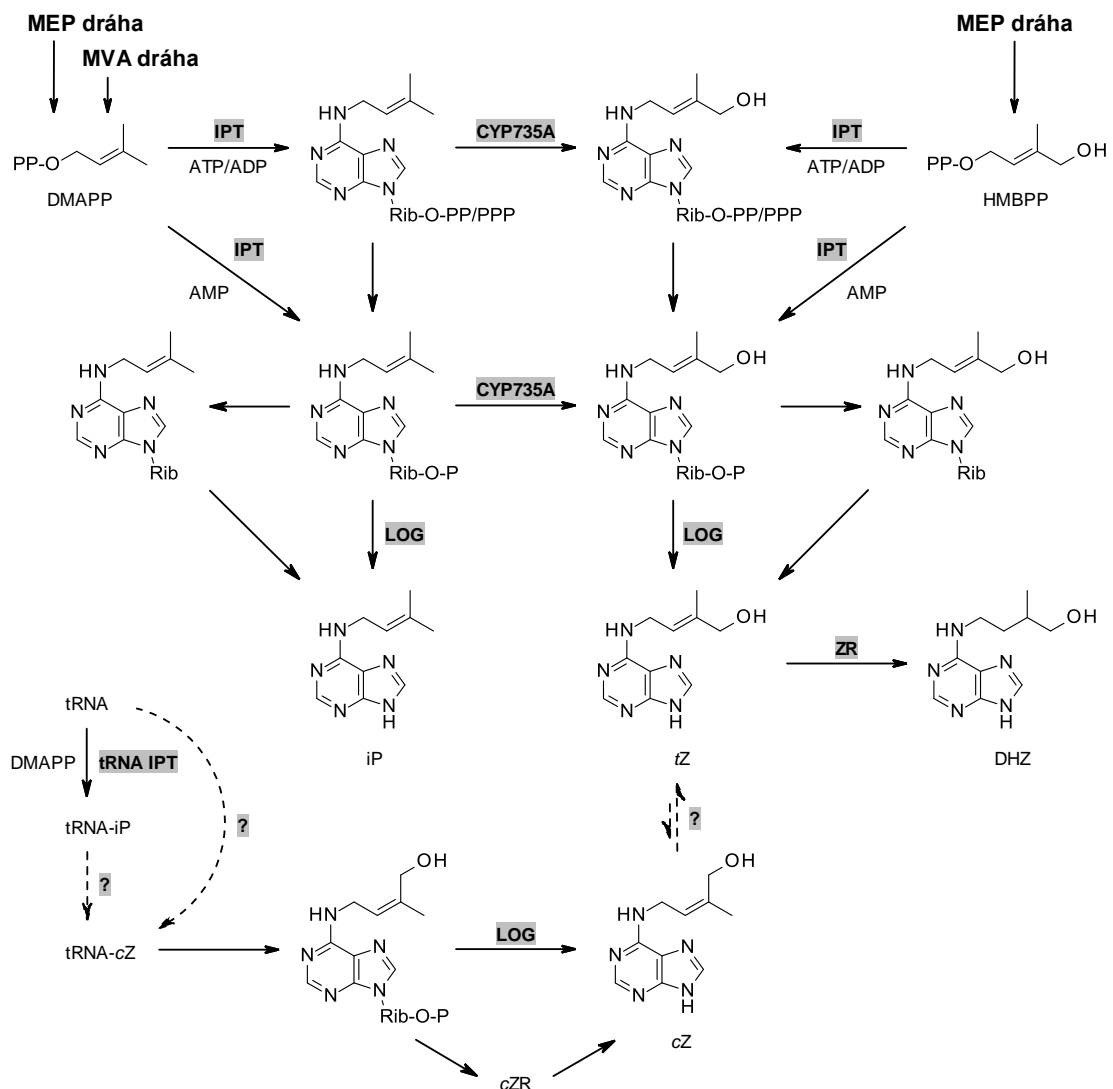
Aromatické cytokininy byly dále nalezeny například v palmovém oleji (Jones et al. 1996), ve vybraných kultivarech mikropropagovaných brambor (Baroja-Fernández et al. 2002), v některých druzích mořských řas (Stirk et al. 2003) a v sinicích (Ördög et al. 2004). Nedávno pak byla detekována stopová množství *oT*, *oTR* a *oT*-*O*-glukosidu v topolu osika (Edlund et al. 2017). Analýza listů z 12 druhů topolů dokládá, že schopnost produkovat aromatické cytokininy je u topolů překvapivě rozšířená, přestože se jejich množství v rostlinném pletivu mezidruhově značně liší. *oTR* byl dokonce detekován v hydrolyzátu tRNA izolované z *Populus deltoides* a *P. × canadensis* (Jaworek et al. 2019a).

### 3.2 Biosyntéza a interkonverze isoprenoidních cytokininů

Stěžejním krokem biosyntézy isoprenoidních cytokininů je adice prenylové skupiny na exocyklický dusík adenosin-5'-fosfátu, případně adeninu vázaného v tRNA (Obr. 2). Tato enzymová reakce je katalyzována isopentenyltransferasami (IPT), které kromě různých forem adeninu využívají jako substrát zejména dimethylallyldifosfát (DMAPP; Barry et al., 1984) a v některých případech také (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát (HMBPP; Krall et al., 2002). DMAPP je produkován primárně mevalonátovou dráhou (MVA), běžně lokalizovanou v cytosolu eukaryotních buněk. Alternativně jsou isopreny biosyntetizovány methylethylerythritolfosfátovou dráhou (MEP), objevenou v bakteriích a v rostlinných plastidech (Rohmer 1999; Lichtenthaler 1999), ve které HMBPP figuruje jako jeden z meziproductů (Hecht et al. 2001).

Isopentenyltransferasy se dělí do dvou skupin na vývojově starší tRNA IPT (EC 2.5.1.75), přítomné téměř ve všech živých organismech, a adenylátové IPT (EC 2.5.1.27) (Frébort et al. 2011). Aktivita adenylátové IPT byla poprvé pozorována v bezbuněčném extraktu hlenky, který katalyzoval biosyntézu iP z AMP a DMAPP, přičemž primárním produktem byl iP nukleotid (Taya et al. 1978). O několik let později se podařilo zjistit, že *Tmr* gen *A. tumefaciens* kóduje IPT a po expresi v *E. coli* také prokázat její funkčnost. Gen je lokalizován na Ti plasmidu („tumor inducing“), zodpovědném za virulenci bakterie, jako součást tzv. T-DNA, která je během infekce integrována do rostlinného genomu (Barry et al. 1984; Akiyoshi et al. 1984). *Agrobacterium tumefaciens* obsahuje ještě další *IPT* gen, označovaný jako *Tzr*, který bakterie exprimuje sama (Morris et al. 1993).

U vyšších rostlin však byla jednoznačná identifikace adenylátových IPT komplikovanější z důvodu malého množství proteinu v rostlinných pletivech a jeho nízké stability. Enzym se podařilo částečně purifikovat z *in vitro* kultury tabáku (Chen a Melitz, 1979) a mnohem později také z nezralých zrn kukuřice (Blackwell a Horgan, 1994). Na základě podobnosti se sekvencemi genů z *A. tumefaciens* a dalších mikroorganismů se nakonec dvěma nezávislým skupinám podařilo v genomu *A. thaliana* identifikovat celkem devět *IPT* genů (*AtIPT*), přičemž *AtIPT2* a *AtIPT9* kódují tRNA IPT (Takei et al. 2001a; Kakimoto 2001). Kromě *Arabidopsis* byly postupně klonovány a charakterizovány některé IPT z řady dalších rostlin, zejména chmele (Sakano et al. 2004), rýže (Sakamoto et al.



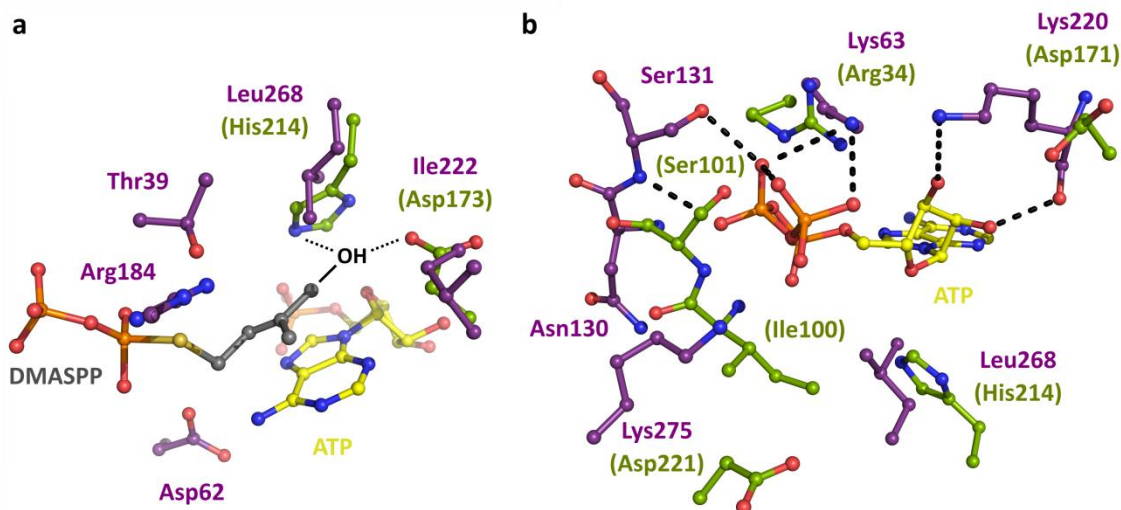
**Obrázek 2** Schéma biosyntézy isoprenoidních cytokininů. IPT = isopentenyltransferasa; CYP735A = cytochrom P450 monooxygenasa; LOG = cytokininribosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasy („Lonely guy“); ZR = zeatinreduktasa.

2006), moruše (Abe et al. 2007), kukuřice (Brugière et al. 2008; Vyroubalová et al. 2009), rajčete (Žižková et al. 2015) a topolu (Jaworek et al. 2019a). Dále byly identifikovány a klonovány IPT z hub *Claviceps purpurea* (Hinsch et al. 2015) a zástupců rodu *Fusarium* (Vrabka et al. 2019).

Doposud se podařilo vyřešit krystalovou strukturu adenylátových IPT z *A. tumefaciens* (Sugawara et al. 2008) a chmele (Chu et al. 2010) a strukturu tRNA IPT z bakterií

*Pseudomonas aeruginosa* (Xie et al. 2007), *E. coli* (Seif a Hallberg, 2009), *Bacillus halodurans* (PDB ID: 2QGN, 3EXA), *Staphylococcus epidermidis* (PDB ID: 3D3Q) a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Zhou a Huang, 2008). Reakční mechanismus je u všech IPT stejný. Jedná se o  $S_N2$  nukleofilní substituci a pro katalytickou aktivitu enzymu jsou esenciální vysoce konzervovaná residua Thr39, Asp62 a Arg184 (Obr. 3a; číslování podle IPT z chmele). Asp62 prostřednictvím vodíkové vazby přímo interaguje s  $N^6$  dusíkem adeninu a slouží jako obecná báze, tedy akceptor protonu. Dusíkový atom následně nukleofilně atakuje  $C^1$  atom DMAPP, případně HMBPP, což vede k transferu prenylové skupiny. Thr39 a Arg184 pak pomáhají stabilizovat přechodný stav a kompenzovat negativní náboj difosfátu (Sugawara et al., 2008; Zhou a Huang, 2008; Chu et al., 2010).

Znalost struktury IPT pomohla vysvětlit rozdíly v pozorované substrátové specificitě enzymů. Ukázalo se, že rekombinantní AtIPT4 jako substrát silně preferuje ATP a ADP, hodnota  $K_m$  pro AMP je řádově vyšší (Kakimoto 2001). Podobně je tomu také u IPT z chmele (Sakano et al. 2004) nebo rýže (Sakamoto et al. 2006), naopak jediným efektivním adeninovým substrátem IPT z *A. tumefaciens* je AMP (Morris et al. 1993; Krall et al. 2002). Chmelová IPT má v ústí aktivního místa dvě bazická residua Lys220 a Lys275 (Obr. 3b), která přímo interagují s  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfáty ATP. U bakteriálního enzymu jsou na odpovídajících pozicích kyselá Asp residua, která podle autorů struktury elektrostatickou repulzí brání vstupu ATP a ADP do aktivního místa (Chu et al. 2010). Ze superpozice obou struktur je patrné, že větší komplikací je sterické bránění  $\beta$ -fosfátu reziduem Ser101 (číslování podle bakteriální Tmr) v důsledku rozdílné velikosti ústí substrátového tunelu (Obr. 3b). Zajímavostí pak je, že IPT z moruše nebo chmele dokáží prenylovat například i některé cytosinové nebo guanosinové nukleotidy (Abe et al. 2007; Chu et al. 2010). V případě tRNA IPT jsou substrátem tRNA, které rozpoznávají kodony začínající uracilem. Dochází k prenylaci adeninu na pozici 37, přičemž tato modifikace napomáhá stabilizovat interakci antikodon-kodon s mRNA (Persson et al. 1994). Oproti adenylátovým IPT obsahují navíc tRNA IPT v ústí kavity aktivního místa helikální doménu, která napomáhá vychlípění adeninu 37 vně struktury tRNA a jeho vstupu do aktivního místa (Zhou a Huang, 2008; Seif a Hallberg, 2009; Chu et al., 2010).



**Obrázek 3** Porovnání aktivního místa (**a**) a ústí tunelu pro vstup adenosinových nukleotidů (**b**) do rostlinné a bakteriální IPT. Rezidua chmelové IPT (PDB číslo 3A8T) jsou znázorněna fialově, rezidua Tmr z *A. tumefaciens* (PDB číslo 2ZE7) zeleně. Analog substrátu dimethylallyl-S-thiodifosfát (DMASPP) pochází z krystalové struktury Tmr, ATP ze struktury chmelové IPT. Hydroxylová skupina v části **a** byla k DMASPP přidána dodatečně, demonstruje možnost vazby HMBPP. Černé přerušované čáry znázorňují polární interakce mezi atomy. Superpozice struktur IPT byla provedena pomocí programu WinCoot, obrázek byl vygenerován a editován v programech PyMol a Inkscape.

Bakteriální a rostlinné adenylátové IPT se liší také v preferenci donoru prenylové skupiny. Zatímco Tmr, IPT z *A. tumefaciens*, má přibližně stejné hodnoty  $K_m$  pro DMAPP i HMBPP, enzym z *Arabidopsis* HMBPP jako substrát nevyužívá (Sakakibara et al. 2005). Z hlediska struktury aktivního místa jsou hlavní příčinou u rostlin vysoce konzervovaná rezidua Ile222 a Leu268 (číslování podle IPT z chmele), která obklopují hydrofobní část DMAPP (Obr. 3a). Tmr má na odpovídajících pozicích rezidua Asp a His, což umožňuje vstup hydroxylové skupiny HMBPP (Sugawara et al. 2008; Chu et al. 2010). Při expresi v rostlinných buňkách je Tmr lokalizován v plastidech, kde je poměr HMBPP ku DMAPP přibližně 5:1. Během bakteriální infekce proto dochází převážně k přímé produkci cytokininů *tZ*-typu s využitím meziproductů MEP dráhy (Sakakibara et al. 2005).

Na základě isotopového značení bylo prokázáno, že MEP dráha je hlavní zdrojem DMAPP také pro biosyntézu *iP*- a *tZ*-typu cytokininů adenylátovými IPT z *Arabidopsis*. AtIPT1, AtIPT3, AtIPT5 a AtIPT8 jsou navíc primárně lokalizovány v plastidech (Kasahara et al. 2004), i když v případě AtIPT3 může dojít ke změně lokalizace do cytosolu



po farnesylovaní jeho C-koncového -CLVA motivu (Galichet et al. 2008). MVA dráha může poskytovat DMAPP pro cytosolární AtIPT4 a mitochondriální AtIPT7 a je také předpokládaným hlavním zdrojem prenylu pro cytosolární tRNA IPT (Kasahara et al. 2004).

Série mutantů *Arabidopsis* s vyřazenými *AtIPT* geny pomohla objasnit příspěvek jednotlivých IPT k celkovým hladinám cytokininů v rostlině. U jednonásobných mutantů byly koncentrace volných cytokininů iP- a tZ-typu sníženy jen v případě *atipt3*. Deficit se pak dále prohluboval při kombinaci této mutace s dalšími a byl extrémně výrazný zejména u mutantů *atipt3 5 7* a *atipt1 3 5 7*. Naopak u nich docházelo k nárůstu koncentrace cZ-typu cytokininů. Ukázalo se, že jejich hlavním zdrojem je minimálně u *Arabidopsis* degradace modifikované tRNA, jelikož dvojnásobný mutant bez funkčních tRNA IPT neobsahoval měřitelné hladiny cytokininů cZ-typu. Obsah cZ v tRNA přitom ovlivňuje převážně AtIPT2. Jeho pokles byl u *atipt2* mutantů výraznější než u *atipt9*, u kterého naopak došlo k razantnímu snížení obsahu v tRNA vázaného iP (Miyawaki et al. 2006). Obdobný rozdíl mezi vlivem jednotlivých tRNA IPT byl pozorován také u topologických ortologů (Jaworek et al. 2019a).

Primárním mechanismem tvorby tZ-typu cytokininů je u rostlin hydroxylace iP, zejména ve formě nukleotidů, katalyzovaná cytochromy P450 (Obr. 2). U *Arabidopsis* se konkrétně jedná o CYP735A1 a CYP735A2, které jsou oba stereospecifické a cZ produkují jen v zanedbatelném množství (Takei et al. 2004). Původ hydroxylové skupiny u cis- isomeru doposud nebyl spolehlivě vysvětlen. V bakterii *Salmonella typhimurium* sice byla objevena cis-hydroxylasa, kódovaná genem *miaE* (Persson a Björk, 1993), u rostlin se však nepodařilo nalézt její homolog. Ani přímá produkce cZ-typu cytokininů s využitím cis-HMBPP jako isoprenoidního prekurzoru není v literatuře popsána. Původně předpokládaná možnost isomerace tZ hypotetickou cis-trans-isomerasou, částečně purifikovanou z nezralých semen fazolu (Bassil et al. 1993), nebyla prokázána. Enzym se dlouhou dobu nedařilo identifikovat a jeho význam byl dále zpochybněn například nepřítomností isomerace u mutantních rostlin *Arabidopsis*, které měly výrazně snížené hladiny tZ, ale nikoliv cZ (Miyawaki et al. 2006). Domnělá cis-trans-isomerasa byla nedávno purifikována z kukuřice a identifikován jako nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa (EC 3.6.1.9). Ukázalo se však, že isomerace *in vitro* probíhá spontánně

za přítomnosti světla a FMN, který enzym produkuje štěpením FAD. Ani nadexprese enzymu však nevedla ke změnám poměru koncentrace *tZ* a *cZ* *in vivo* (Hluska et al. 2017).

Aktivace primárních produktů biosyntézy, cytokininových nukleotidů, je spojena s odštěpením fosfátů a ribosy (Obr. 2). Na interkonverzi jednotlivých forem cytokininů se mohou podílet enzymy obecného purinového metabolismu, jejich afinita k cytokininům je však nízká. Koncentrace cytokininů v rostlinném pletivu jsou navíc řádově nižších než ostatních derivátů adeninu. Defosforylaci pravděpodobně katalyzují hojně se vyskytující alkalické (EC 3.1.3.1) nebo kyselé fosfatasy (EC 3.1.3.2), případně 5'-nukleotidasa (EC 3.1.3.5) (Galuszka et al. 2008). Na odštěpení ribosy se pak podílí nukleosid-*N*-ribohydrolasy (NRH; EC 3.2.2.-; Kopečná et al. 2013). Ribosa může být k cytokininovým bázím také znovu připojena a vzniklé nukleosidy dále fosforylovány, což se projevuje zejména při exogenní aplikaci cytokininů (např. Sondheimer a Tzou, 1971; Letham a Zhang, 1989). Fosforylaci nukleosidů katalyzuje adenosinkinasa (EC 2.7.1.20; von Schwartzenberg et al. 1998; Kwade et al. 2005), ale cytokininové báze mohou být také převedeny rovnou na nukleotidy adeninfosforibosyltransferasou (EC 2.4.2.7; Schnorr et al. 1996; Allen et al. 2002). Výše zmíněné enzymy jsou ovšem obvykle exprimovány konstitutivně, což omezuje možnost citlivé regulace jimi katalyzovaných přeměn cytokininů (Frébort et al. 2011).

Pro porozumění regulace biosyntézy aktivních forem cytokininů byl stěžejní objev cytokininribosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasy (EC 3.2.2.n1), která v jediném kroku specificky štěpí cytokininové nukleosidmonofosfáty rovnou na volné báze (Obr. 2). Enzym je běžně označován jako „LONELY GUY“ (LOG), jelikož květy rýže s mutací v příslušných genech často obsahovaly jedinou tyčinku a žádné pestíky (Kurakawa et al. 2007). LOG byl původně anotován jako hypotetická lysindekarboxylasa, přestože takovou katalytickou aktivitu postrádá (např. Kurakawa et al., 2007; Pertry et al., 2010). Ve vědecké komunitě se však tato mylná anotace projevuje dodnes (Naseem et al. 2018). Struktura dvou homologů přítomných v *Arabidopsis*, která jich obsahuje celkem devět (Kuroha et al. 2009), byla vyřešena dokonce před odhalením jejich skutečné funkce (Jeon et al. 2006). Klíčová úloha LOG v cytokininovém metabolismu byla později jednoznačně demonstrována na rostlinách s mnohonásobnou mutací v *log* genech (Tokunaga et al. 2012). Kromě výskytu LOG napříč rostlinnými druhy byl jeho homolog popsán také jako

součástí *fas* operonu *R. fascians* (Pertry et al. 2010). Ještě zajímavější je potom existence bifunkčních enzymů kombinujících IPT a LOG domény u hub rodu *Claviceps* (Hinsch et al. 2015) a *Fusarium* (Vrabka et al. 2019).

Na závěr této kapitoly zbývá stručně shrnout dostupné informace o původu DHZ. Za jeho zdroj je považována redukce zeatinu (Obr. 2) domnělou zeatinreduktasou (EC 1.3.1.69), která však dodnes nebyla jednoznačně identifikována. Tato konverze byla poprvé pozorována u embryí fazolu klíčených za přítomnosti radioaktivně značeného *tZ* (Sondheimer a Tzou, 1971). Enzym byl později částečně přečištěn a charakterizován. Reakce vyžaduje jako kofaktor NADPH (Martin et al. 1989). Konverze *tZ* na DHZ byla zaznamenána také například v listech hrachu, kde může sloužit pro udržení cytokininové homeostázy (Gaudinová et al. 2005), jelikož DHZ je rezistentní k enzymatické degradaci běžné pro ostatní typy isoprenoidních cytokininů (např. Kamínek et al., 1997; Galuszka et al., 2007).

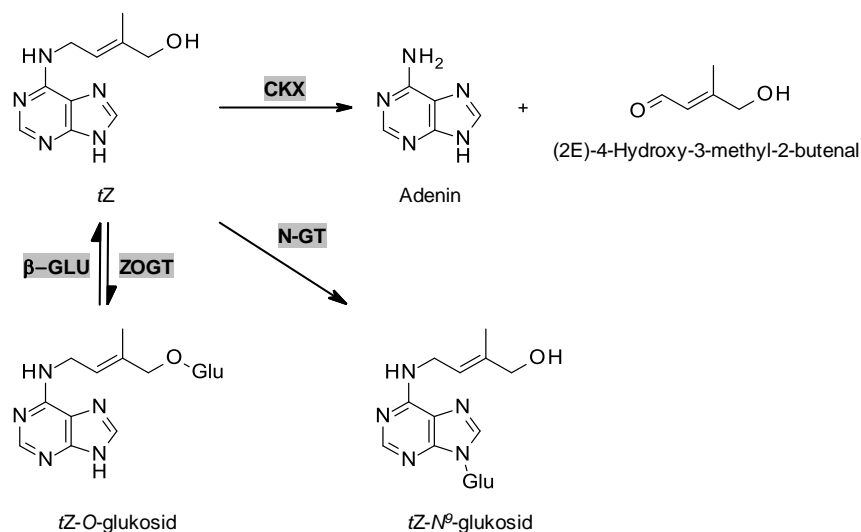
### 3.3 Degradace a inaktivace cytokininů

Pro regulaci hladin aktivních cytokininů v rostlinném pletivu je vedle biosyntézy neméně důležitá jejich degradace nebo inaktivace. Nevratná degradace cytokininů je založena na jejich oxidativním štěpení, které bylo poprvé pozorováno po přidavku radioaktivně značeného iP ribosidu (iPR) k hrubému extraktu pletiv tabáku (Pačes et al. 1971). Zodpovědný enzym byl částečně přečištěn z obilek kukuřice a původně pojmenován jako cytokininoxidasa, jelikož katalyzuje oxidativní štěpení cytokininů na adenin, případně jeho  $N^9$ - substituovaný derivát (Whitty a Hall, 1974), a aldehyd postranního řetězce (Obr. 4) (Brownlee et al. 1975). Z důvodu nízkého obsahu enzymu v rostlinných pletivech se jej dlouho nedařilo izolovat v dostatečném množství a čistotě pro detailní charakterizaci. Zlomovým okamžikem byla až identifikace genu kódujícího jeden s isoenzymů v kukuřici (Morris et al. 1999; Houba-Hérin et al. 1999). Brzy poté bylo zjištěno, že enzym je schopen efektivněji využívat i jiné akceptory elektronů než molekulární kyslík, zejména chinony (Galuszka et al. 2001; Frébortová et al. 2004). Enzym byl proto překlasifikován na cytokinindehydrogenasu (CKX; EC 1.5.99.12).

Primárním akceptorem elektronů je ovšem FAD, v aktivním místě kovalentně vázaný přes His residuum (Malito et al. 2004). CKX oxidují cytokininy na iminový meziprodukt, který následně podléhá hydrolýze. Reoxidace  $FADH_2$  je pak krokem omezujícím rychlost

katalytické reakce (Popelková et al. 2006). Je-li finálním akceptorem elektronů kyslík, enzym katalyzuje produkci jedné molekuly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na každou molekulu cytokininového substrátu (Kopečný et al. 2005). Z umělých elektronových akceptorů jsou nejefektivnější 2,6-dichlorofenolindofenol a fenazin methosulfát. Mezi potenciální přirozeně se vyskytující akceptory elektronů potom patří koenzym Q<sub>0</sub>, prekursor ubichinonu (Galuszka et al. 2001), nebo 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on a volné radikály vzniklé jeho oxidací (Frébortová et al. 2010).

Cytokinindehydrogenasy jsou u vyšších rostlin obvykle kódovány malou genovou rodinou. Počet CKX se mezidruhově liší, například u *Arabidopsis* jich bylo identifikováno sedm (Bilyeu et al. 2001; Werner et al. 2003), v rýži 11 (Ashikari et al. 2005) a v genomu kukuřice 13 (Massonneau et al. 2004; Vyroubalová et al. 2009). Exprese jednotlivých CKX genů se liší mezi různými pletivy a vývojovými stádii rostlin. Funkční diverzifikaci isoformů CKX dále podtrhuje jejich rozdílná subcelulární lokalizace. Čtyři z CKX *Arabidopsis*, AtCKX2 a AtCKX4-6, jsou sekretovány do apoplastu, AtCKX1 a AtCKX3 jsou vakuolární a pouze AtCKX7 neobsahuje signální peptid, zůstává tedy v cytosolu (Werner et al. 2003; Kowalska et al. 2010). U kukuřice je situace obdobná,



**Obrázek 4** Schéma degradace a inaktivace cytokininů na příkladu *trans*-zeatinu. CKX = cytokinindehydrogenasa; ZOGT = zeatin-*O*-glukosyltransferasa; β-GLU = β-glukosidasa; N-GT = *N*-glukosyltransferasa.

pravděpodobně také obsahuje pouze jedinou cytosolární isoformu, ZmCKX10 (Šmehilová et al. 2009; Zalabák et al. 2014). Jednotlivé isoformy se značně liší i v substrátové specificitě a enzymové aktivitě (Galuszka et al. 2007; Zalabák et al. 2014). CKX jsou navíc často bohatě glykosylovány, což ovlivňuje jejich pH optimum, translokaci i stabilitu (Schmülling et al. 2003).

Alternativním mechanismem pro snížení koncentrace aktivních cytokininů v rostlinném pletivu je jejich konjugace s glukosou, případně xylosou. Ke glykosylaci dochází typicky na hydroxylové skupině postranního řetězce cytokininů, je-li přítomna, a na purinovém skeletu v polohách  $N^7$  nebo  $N^9$ . Rozdíl mezi *O*-glykosidy a *N*-glykosidy je nejen v reverzibilitě glykosylace (Mok a Mok, 2001), ale také v možnosti jejich odbourání CKX. Zatímco *O*-glykosidy nejsou substráty CKX,  $N^9$ -glykosidy jsou některými isoenzymy štěpeny dokonce efektivněji než příslušné báze (Galuszka et al. 2007; Zalabák et al. 2014).

Tvorbu *O*-glykosidů katalyzují *trans*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa (ZOGT; EC 2.4.1.203) (Obr. 4) a zeatin-*O*-xylosyltransferasa (EC 2.4.2.40), které využívají jako substrát UDP-glukosu, respektive UDP-xylosu. Oba enzymy byly poprvé izolovány a částečně přečištěny z nezralých embryí dvou různých druhů fazolu (Turner et al. 1987; Dixon et al. 1989), později se ze stejných rostlin také podařilo klonovat příslušné geny (Martin et al., 1999a,b). V kukuřici (Martin et al. 2001; Veach et al. 2003) a v rýži (Kudo et al. 2012) byly dále identifikovány *cis*-zeatin-*O*-glukosyltransferasy (EC 2.4.1.215) schopné, na rozdíl od enzymů z fazolu, glykosylovat specificky *cZ*. Ze 105 studovaných rekombinantních glykosyltransferas *Arabidopsis* je pět schopných modifikovat cytokininy (Hou et al. 2004). Jejich specificita k cytokininům byla *in vivo* prokázána u tří z nich, ale pouze v jednom případě se jedná o ZOGT (Jin et al. 2013). Gen kódující tuto ZOGT je výrazně exprimován v senescentních listech *Arabidopsis*, což je doprovázeno několikanásobným nárůstem koncentrace *tZ-O*-glukosidu (Šmehilová et al. 2016). Aktivní cytokininy mohou být z *O*-glykosidů opětovně uvolněny  $\beta$ -glukosidasou (EC 3.2.1.21), která je přinejmenším v kukuřici a řepce exprimována zejména v intenzivně se dělicích pletivech mladých rostlin (Brzobohatý et al., 1993; Falk a Rask, 1995). *O*-glykosidy jsou proto považovány za zásobní formu cytokininů.

Nevratnou glykosylaci cytokininů v polohách  $N^7$  nebo  $N^9$  katalyzují *N*-glukosyltransferasy (EC 2.4.1.118) (Obr. 4), poprvé izolované z děložních lístků ředkve

(Entsch a Letham, 1979). Donorem glukosy je i v tomto případě UDP-glukosa a substrátem těchto enzymů jsou obvykle isoprenoidní i aromatické cytokinininy. V *Arabidopsis* byly objeveny dvě *N*-glykosyltransferasy (Hou et al. 2004). Jejich podíl na udržení cytokininové homeostázy *in vivo* byl později potvrzen při podrobnějším studiu rostlin s mutací v příslušných genech (Wang et al. 2011, 2013b). Zejména jeden z dvojice enzymů, označovaný jako UGT76C2, je výrazně nadexprimován při exogenní aplikaci cytokininů (Šmehilová et al. 2016). Mutant *ugt76c2* měl za fyziologických podmínek menší semena než rostliny divokého typu (WT; z anglického „wild type“) a byl k exogenní aplikaci cytokininů citlivější (Wang et al. 2011). *N*-glukosylace je také ovlivněna suchem a osmotickým stresem (Li et al. 2015).

### 3.4 Transport cytokininů

Cytokinininy zprostředkovávají chemickou signalizaci nejen lokálně v místě jejich produkce, ale jsou také transportovány mezi rostlinnými orgány prostřednictvím floému a xylému (Hirose et al. 2008). Neméně důležitý, avšak doposud nedostatečně objasněný, je mechanismus transportu cytokininů přes buněčné membrány. Podílí se na něm ABC transportéry (z anglického ATP „binding cassette“), obecné purinové permeasy a nukleosidové transportéry. Předpokládá se však existence i dalších, doposud neobjevených transportérů (Kieber a Schaller, 2018).

Za místo biosyntézy cytokininů byly tradičně považovány kořeny, odkud jsou xylémem transportovány do nadzemní části rostlin (Letham a Palni, 1983). Ve skutečnosti jsou cytokinininy produkovány napříč rostlinnými orgány, čemuž odpovídá exprese *IPT* genů v *Arabidopsis* (Miyawaki et al. 2004). Naopak geny kódující cytochromy CYP735A jsou až na výjimky exprimovány hlavně v kořenech (Takei et al. 2004). Tento fakt velmi dobře koreluje s distribucí jednotlivých cytokininů v cévních svazcích. Xylémem je akropetálně transportován zejména ribosid *tZ* (*tZR*) a v menší míře také *tZ* (Beveridge et al. 1997; Takei et al. 2001b; Hirose et al. 2008). Koncentrace *tZR* v xylémové šťávě navíc dramaticky vzrůstá při opětovném dodání anorganického dusíku rostlinám kukuřice pěstovaným za jeho nedostatku (Takei et al. 2001b). V reakci na dostupnost dusíku také dochází ke změně poměru transportovaného *tZ* a *tZR*, které mají nejspíš při akropetální signalizaci rozdílnou funkci. Zatímco transportovaný *tZ* u *Arabidopsis* ovlivňuje hlavně velikost listů, *tZR* navíc reguluje i aktivitu apikálního meristému (Osugi et al. 2017).

Floémová šťáva pak obsahuje zejména iP-typ cytokininů (Corbesier et al. 2003), které jsou transportovány bazipetálně (Hirose et al. 2008). Rozdílný směr transportu *tZ*- a iP-typů cytokininů dále potvrzují experimenty založené na roubování WT *Arabidopsis* a čtyřnásobného mutantu *atipt1 3 5 7* (Matsumoto-Kitano et al. 2008), který má dramaticky snížené hladiny obou typů cytokininů (Miyawaki et al. 2006). Je-li naroubována nadzemní část mutantní rostliny na kořeny WT, dochází k návratu koncentrace *tZ*-typu cytokininů v nadzemní části na fyziologické hladiny, ale koncentrace iP-typu cytokininů zůstává nízká. Obdobný, avšak obrácený efekt byl pozorován po naroubování nadzemní části WT na kořeny mutantní rostliny (Matsumoto-Kitano et al. 2008). Bazipetální transport cytokininů floémem probíhá symplasticky a bylo prokázáno, že má vliv na regulaci uspořádání cévních svazků v kořeni *Arabidopsis* (Bishopp et al. 2011) nebo tvorbu hlízek u bobovitých rostlin (Sasaki et al. 2014).

Pro transport cytokininů z buněk do apoplastu a jejich nakládání do xylému v kořenech je klíčový ABC transportér podrodiny G, u *Arabidopsis* konkrétně ABCG14, což dokládají dvě nezávislé studie (Zhang et al. 2014; Ko et al. 2014). Tento druh transportérů katalyzuje hydrolýzu ATP, která umožňuje konformační změnu jeho transmembránové domény a následný průchod substrátu skrz plasmatickou membránu (Locher 2016). Lokalizace ABCG14 v plasmatické membráně byla ověřena jeho fúzí se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP; z anglického „green fluorescent protein“). Gen *ABCG14* je exprimován primárně v buňkách centrálního cylindru kořene a jeho nefunkčnost se u mutantních rostlin projevuje podstatně menším vzrůstem nadzemní části než u WT (Zhang et al. 2014; Ko et al. 2014). Tento fenotyp je možné zvrátit exogenní aplikací *tZ*, ale nikoliv iP, na listy *abcg14* mutantu nebo naroubováním nadzemní části mutantní rostliny na kořeny WT (Ko et al. 2014). Obsah *tZ*-typu cytokininů v nadzemní části i xylémové šťávě je u *abcg14* mutantů oproti WT výrazně snížen, což je doprovázeno vzrůstem jejich koncentrace v kořenech. Mutantní rostliny mají také podstatně nižší kapacitu akropetálně transportovat *tZ* přidány do růstového média (Zhang et al. 2014; Ko et al. 2014). Experiment založený na sledování akumulace  $C^{14}$  značeného *tZ* v buňkách listů rostlin nadexprimujících ABCG14 v porovnání s WT ukazují, že ABCG14 slouží primárně k exportu cytokininů z buněk (Zhang et al. 2014).

Analogické transportéry schopné specificky importovat cytokininy do buněk a nakládat iP-typ cytokininů do floému nebyly doposud identifikovány. Na těchto procesech se nicméně podílejí obecné transportéry purinů či nukleosidů. V případě purinů se jedná o purinové permeasy (PUP), do jejichž rodiny u *Arabidopsis* patří 21 zástupců. Tento počet komplikuje studium významu PUP transportu cytokininů *in planta* s využitím „loss-of-function“ mutantů, neboť může docházet ke kompenzaci vyřazených PUP v důsledku překryvu jejich aktivit (Cedzich et al. 2008). Jako první rostlinná PUP byla identifikována AtPUP1 z *Arabidopsis* pomocí snahy o komplementaci mutantních kvasinek neschopných příjmu adeninu z média, do kterých byly vnášeny cDNA expresní knihovny *Arabidopsis*. Transport adeninu prostřednictvím AtPUP1 pak byl kompetitivně inhibován kinetinem a *tZ* (Gillissen et al. 2000). Schopnost AtPUP1 transportovat cytokininy byla později potvrzena s využitím tritiovaného *tZ*. Při expresi v kvasinkách byla aktivními cytokininy kompetitivně inhibována také AtPUP2, oba transportéry jsou přitom exprimovány zejména v nadzemní části *Arabidopsis* (Bürkle et al. 2003).

Jako nejvýraznější z této skupiny transportérů se jeví AtPUP14, která je silně exprimována napříč rostlinnými orgány i vývojovými stádii (Zürcher et al. 2016). AtPUP14 je schopna transportovat cytokininy do protoplastů odvozených z mezofylových buněk i do frakce tabákových mikrosomů, avšak její kinetické parametry nejsou známy. Umlčení exprese *AtPUP14* pomocí indukovaně nadexprimované miRNA se na embryích *Arabidopsis* projevuje viditelnými morfologickými defekty. Důvodem je aktivace cytokininové signalizace i v těch buňkách embrya, které jsou za normálních podmínek k exogenně aplikovaným cytokininům necitlivé. Autoři dedukují, že AtPUP14 odčerpává aktivní cytokininy z apoplastu do cytosolu a v důsledku tak omezuje aktivaci cytokininových receptorů lokalizovaných v plasmatické membráně (Zürcher et al. 2016).

Navrhovaný model ovšem nereflektuje dvě zásadní skutečnosti, na které upozorňují nedávno publikované přehledné články (Durán-Medina et al. 2017; Romanov et al. 2018). První z nich je pravděpodobná lokalizace cytokininových receptorů převážně do membrány endoplasmatického retikula (Caesar et al. 2011; Wulfetange et al. 2011; Lomin et al. 2018), transport cytokininů z apoplastu do buněk proto může být pro jejich aktivaci naopak klíčový. Problematika lokalizace cytokininových receptorů však doposud není dostatečně objasněna a bude podrobněji rozvedena v následující kapitole. Druhé úskalí



prezentovaného modelu spočívá v neznámé afinitě AtPUP14 k cytokininům, což je pro porozumění jejich fyziologické úloze podstatná informace. Nicméně  $K_m$  pro *tZ* bylo v případě AtPUP1 stanoveno přibližně na 40  $\mu\text{M}$  a AtPUP2 pravděpodobně dosahuje srovnatelných hodnot (Bürkle et al. 2003). Je možné, že AtPUP14 je součástí transportního systému s vysokou afinitou ( $K_m$  přibližně 200 nM), který byl u *Arabidopsis* pozorován, ale jednoznačně neobjasněn (Cedzich et al. 2008). Transport cytokininů do cytosolu prostřednictvím AtPUP14 přesto nemusí být dostatečně efektivní, aby aktivaci receptorů v plasmatické membráně zabránil (Romanov et al. 2018). Jejich zdánlivé (stanoveny kompeticí) disociační konstanty pro *tZ* se totiž pohybují v rozmezí 1-8 nM (Romanov et al. 2006; Lomin et al. 2015).

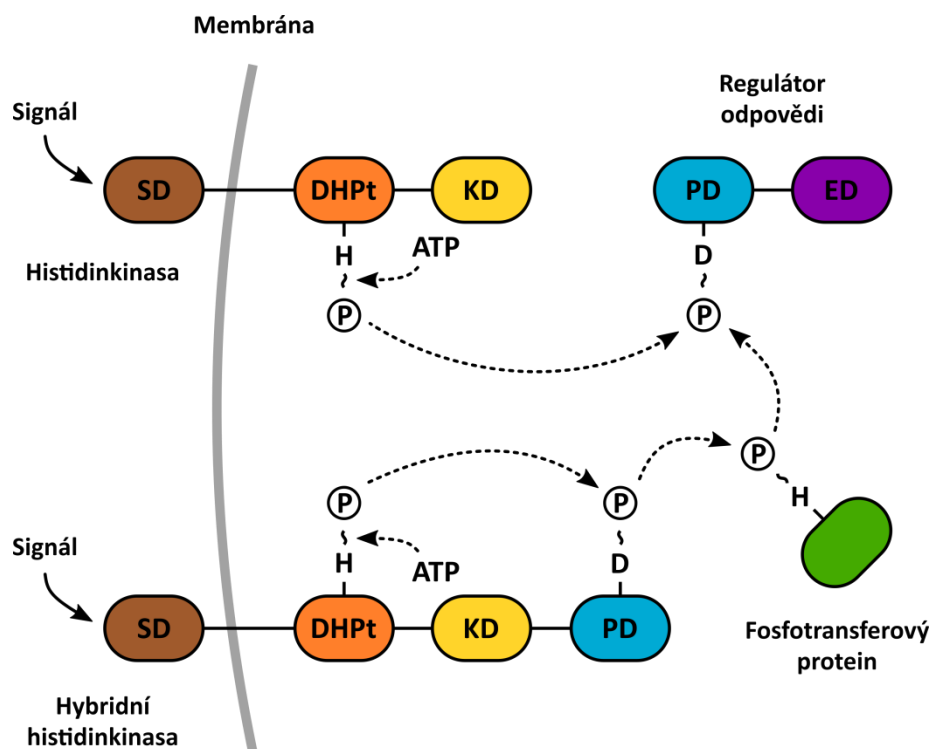
Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) jsou druhou skupinou obecných transportérů, z nichž se alespoň některé mohou podílet na transportu cytokininových ribosidů. Jako první domnělý rostlinný ENT byl identifikován AtENT1 z *Arabidopsis*, lokalizovaný v plasmatické membráně (Li a Wang, 2000). Později byla prokázána jeho schopnost transportovat adenosin pomocí funkční komplementace kvasinek deficientních v biosyntéze adeninu. Ukázalo se však, že typické inhibitory ENT jeho funkci neovlivňují, naopak je závislý na protonovém gradientu. V případě AtENT1 se tedy jedná spíše o koncentrativní nukleosidový transportér (Möhlmann et al. 2001). *Arabidopsis* obsahuje celkem 8 AtENT homologů, přičemž kinetické parametry, expresní profily a subcelulární lokalizace částí z nich byla studována blíže (Li et al. 2003; Wormit et al. 2004). Souvislost mezi ENT a cytokininy byla objevena během hledání „loss-of-function“ mutací vedoucích k potlačení fenotypu způsobeného nadprodukcí cytokininů u *Arabidopsis*. Rostliny mutantní v genech *atent3* a *atent8* byly méně citlivé k aplikaci iPR a *tZR*, ale nikoliv příslušných volných bází. Příjem iPR z růstového média byl také u obou mutantů snížen, ale příjem *tZR* byl výrazně nižší jen u *atent3* (Sun et al. 2005). Během kompetičního testu vybraných AtENT v kvasinkovém expresním systému byl ovšem import adenosinu prostřednictvím AtENT3 a také AtENT7 inhibován iPR a *tZR* pouze slabě. Podstatně silnější inhibiční účinek iPR byl pozorován v případě AtENT6. Tento transportér má výrazně vyšší afinitu k iPR ( $K_m = 17 \mu\text{M}$ ) než k *tZR* ( $K_m = 630 \mu\text{M}$ ) (Hirose et al. 2008). Velice podobné hodnoty  $K_m$  byly stanoveny také pro OsENT2 z rýže, který byl doposud jako jediný z celkových čtyř OsENT detailněji charakterizován (Hirose et al. 2005).

### 3.5 Cytokininové receptory a signalizace

Jedním z nejvýznamnějších mechanismů přenosu signálu uvnitř buněk je fosforylace regulačních proteinů katalyzovaná proteinkinasami. Kinasovou aktivitu má často i sám receptor stojící na počátku signalizační kaskády (Schenk a Snaar-Jagalska, 1999). Eukaryotní proteinkinasy ve většině případů fosforylují postranní řetězce Ser, Thr nebo Tyr. U prokaryotních organismů pak dominuje fosforylace reziduí His a Asp v rámci takzvaného systému dvou komponent (TCS; z anglického „two-component system“), který zahrnuje receptorovou histidinkinasu, tvořící obvykle homodimer, a regulátor odpovědi (Obr. 5) (West a Stock, 2001). Význam TCS je pro přežití prokaryotních organismů zcela zásadní. Je na něm založena převážná většina senzorů umožňujících bakteriím reagovat na změny vnějšího prostředí. TCS se však v menší míře vyskytuje také u některých nižších eukaryotních organismů a rostlin, pravděpodobně v důsledku horizontálního genového transferu z bakterií nebo endosymbiotické události při vzniku plastidů (Capra a Laub, 2012).

Histidinkinasa (HK) prototypické bakteriální TCS se skládá ze tří hlavních domén: extracelulární senzorké, dimerizační a histidin obsahující fosfotransferové domény (DHPt) a ATP vázající kinasové domény (West a Stock, 2001). Percepce signálu senzorkou doménou vede ke konformační změně, která se pohybem helikálních segmentů přenáší na cytosolární domény a dochází k aktivaci kinasy (Wang et al., 2013). Po autofosforylaci konzervovaných His reziduí na DHPt obou HK monomerů dochází k jejich interakci s přijímací doménou regulátoru odpovědi (RR; z anglického „response regulator“), která dále katalyzuje přenos fosfátu na vlastní konzervované Asp reziduum (Obr. 5, horní část). RR je tímto aktivován a jeho efektorová doména, která je typicky transkripčním faktorem, zprostředkovává reakci buňky na přijatý signál (Gao a Stock, 2009). Inaktivace defosforylací je často katalyzována samotným RR, případně specifickými fosfatasami nebo příslušnou HK, jejíž kinasová doména se v inaktivním stavu receptoru může chovat jako fosfatasa (Zschiedrich et al. 2016).

Téměř 25 % všech známých HK je takzvaně hybridních, obsahují navíc přijímací doménu typickou pro RR. Tyto hybridní HK jsou součástí vícestupňových TCS zahrnujících ještě histidin obsahující fosfotransferový protein (HPt), který je v signalizační kaskádě zařazen mezi HK a RR (Obr. 5, dolní část). Fosfátová skupina je tedy v rámci



**Obrázek 5** Schématické znázornění přenosu signálu prostřednictvím klasického prokaryotního TCS (nahore) a vícestupňového TCS s hybridní HK (dole). SD = senzorická doména; DHPT = dimerizační a histidin obsahující fosfotransferová doména; KD = kinasová / katalytická doména; PD = přijímací doména; ED = efektorová doména. Obrázek byl vytvořen podle předlohy (Capra a Laub, 2012).

vícestupňové TCS přenášená celkem čtyřikrát, střídavě na rezidua His a Asp. Jelikož HPT postrádají kinasovou i fosfatasovou aktivitu, tento mezistupeň pravděpodobně neslouží k zesílení signálu. Zapojení většího počtu proteinů spíše umožňuje citlivější regulaci signální dráhy (Gao a Stock, 2009).

Genom *Arabidopsis* obsahuje 16 HK nebo jim příbuzných proteinů, které jsou ve své většině hybridního typu. Výjimky je možné nalézt ve skupině celkem pěti ethylenových receptorů *Arabidopsis*, mezi které patří vůbec první objevená rostlinná HK označovaná jako ETR1 (Chang et al. 1993). Tři z ethylenových receptorů jsou hybridního typu, zatímco dva zbývající přijímací doménu postrádají. Část z nich navíc i přes zřejmou evoluční blízkost ztratila strukturní motivy nezbytné pro HK aktivitu a namísto His fosforylují Ser nebo Thr rezidua (Gallie 2015). Z hlediska Ser/Thr kinasové aktivity a evoluční příbuznosti k HK jsou na tom stejně také rostlinné fytochromy (Yeh a Lagarias, 1998), kterých bylo

u *Arabidopsis* identifikováno rovněž pět (Clack et al. 1994). Další hybridní HK *Arabidopsis*, AHK1, funguje jako osmosenzor (Urao et al. 1999). Ze zbývajících pěti HK jsou tři prokazatelně cytokininovými receptory (AHK2, AHK3 a AHK4), zatímco funkce dvou dalších (CKI1 a CKI2) není dostatečně objasněna (Kakimoto 2003).

První objevená HK, u které byla pozorována souvislost s cytokininovou signalizací, byla při nadexprimování v kalusové kultuře *Arabidopsis* schopná stimulovat cytokininovou odezvu i bez přítomnosti cytokininů v pěstebním médiu. Proto je označována jako CKI1, tedy cytokinin-independentní (Kakimoto 1996). Později se ukázalo, že CKI1 není schopná vázat cytokininy a je aktivována konstitutivně (Yamada et al. 2001), nicméně její exprese v samičích pohlavních buňkách je nepostradatelná pro vývoj zárodečného vaku (Pischke et al., 2002; Hejácíko et al., 2003). Růst kalusu při nadexprimování stimuluje také CKI2, o jejíž fyziologické funkci však nejsou dostupné žádné informace. Jedná se o jedinou rostlinnou HK, která postrádá transmembránový segment a předpokládá se její lokalizace v cytosolu (Kakimoto 2003).

K identifikaci skutečných cytokininových receptorů vedlo několik nezávislých linií výzkumu. Mutace označovaná jako *wooden leg (wol)*, která vedla k narušení přirozené organizace cévních svazků v kořeni *Arabidopsis* (Scheres et al. 1995), byla způsobena záměnou Thr na Ile v receptorové doméně tehdy blíže neurčené HK (Mähönen et al. 2000). Brzy po tomto zjištění byly v genomu *Arabidopsis* identifikovány tři receptorové HK označené jako AHK2, AHK3 a AHK4 (Ueguchi et al. 2001). Dvě skupiny nezávisle na sobě následně prokázaly, že AHK4 (označovaný také jako CRE1 podle cytokinin rezpozivních mutantů *Arabidopsis*) je cytokininový receptor identický s HK kódovanou genem *WOL* (Suzuki et al. 2001; Inoue et al. 2001). Rostliny mutantní v genu *ahk4* vykazovaly sníženou odpověď na exogenní aplikaci cytokininů. Exprese *AHK4* v kvasinkách deficientních v genu *SLN1* (HK osmosenzor) navíc v přítomnosti cytokininů dokázala zvrátit tuto jinak letální mutaci (Inoue et al. 2001). Konkurenční skupina dále demonstrovala schopnost AHK4 komplementovat hybridní HK *E. coli* a prostřednictvím navazujících komponent bakteriální TCS spouštět expresi reportérového genu (kódujícího  $\beta$ -galaktosidasu), který byl klonován do příslušného operonu (Suzuki et al. 2001). Tento systém umožnil prostřednictvím sledování aktivace  $\beta$ -galaktosidasu v závislosti na koncentraci přidaných cytokininů porovnávat jejich afinitu k receptoru. Méně výrazná

exprese reportérového genu byla pozorována také v případě AHK3 (Yamada et al. 2001), pro AHK2 však bakteriální systém nebyl použitelný (Suzuki et al. 2001).

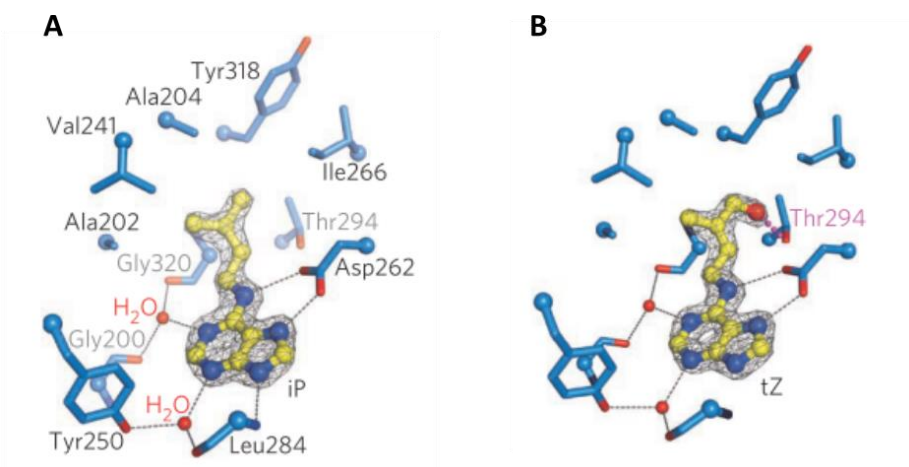
Jednoznačný důkaz, že všechny tři receptory rozpoznávají cytokininy *in planta*, přinesly experimenty s rostlinami *Arabidopsis* mutantními v příslušných genech. Nadzemní části rostlin mutantních v jediném z genů stejně jako dvojité mutanti *ahk2 ahk4* nebo *ahk3 ahk4* nevykazovaly výraznější fenotyp. Velikost listů byla však podstatně menší u dvojitého mutanta *ahk2 ahk3* a tento defekt se dále prohloubil při vyřazení všech tří genů. Trojitý mutant měl dále jako jediný výrazně kratší kořen (Nishimura et al. 2004; Higuchi et al. 2004). Rozdíly oproti WT rostlinám byly i u jednonásobných mutantů patrnější při exogenní aplikaci cytokininů. K snížené inhibici růstu kořene v tomto případě docházelo také u mutanta *ahk4*, přičemž vícenásobné mutace měly aditivní efekt (Higuchi et al. 2004). Citlivost k cytokininům aplikovaným ke kalusové kultuře byla nezměněna pouze v případě mutanta *ahk2* (Nishimura et al. 2004). Tato pozorování společně s intenzitou exprese jednotlivých receptorů v různých rostlinných orgánech naznačují, že i přes překrývající se funkce receptorů mají AHK2 a AHK3 dominantní úlohu v nadzemní části, zatímco AHK4 v kořenech (Higuchi et al. 2004; Stolz et al. 2011).

N-koncová doména všech cytokininových receptorů, pojmenovaná jako CHASE (z anglického cyclase/histidine kinase-associated sensory extracellular), je obklopena dvěma transmembránovými segmenty a je zodpovědná za samotnou vazbu ligandu (Anantharaman a Aravind, 2001; Mougél a Zhulin, 2001). Struktura CHASE domény AHK4 krystalizované s různými cytokininy ve vazebném místě byla vyřešena (Hothorn et al. 2011), což umožňuje vysvětlit rozdílnou afinitu receptoru k jednotlivým ligandům. První systematická studie porovnávací aktivaci AHK3 a AHK4 různými cytokininy (Spíchal et al. 2004) využívala *E. coli* expresní systém produkující  $\beta$ -galaktosidasu v odezvě na cytokininový signál (Suzuki et al. 2001). Tento systém však umožnil pouze relativní porovnání afinit, proto byl později upraven na kompetiční test. Studovaný cytokinin přidávaný v různých koncentracích k živé bakteriální kultuře zde kompetuje o vazbu na exprimovaný receptor s tritiem značeným *tZ*. Následně se prostřednictvím měření radioaktivity sleduje, jaké množství [ $^3$ H]-*tZ* zůstalo na receptorech navázáno, což umožňuje přesně stanovit kinetické parametry vazby ligandu (Romanov et al. 2005, 2006). Alternativou je analogický test provedený s mikrosomálními membránami izolovanými

z listů tabáku, který přechodně exprimuje receptory z jiného rostlinného druhu (Lomin et al. 2015).

Kromě receptorů z *Arabidopsis*, které byly charakterizovány ve všech výše citovaných člancích, jsou dnes již dostupné ligandové specifity pro receptory z řady dalších rostlin. Zejména se jedná o kukuřici (Yonekura-Sakakibara et al. 2004), rýži (Choi et al. 2012), brkev řepku (Kuderová et al. 2015), jabloň (Daudu et al. 2017), brambor (Lomin et al. 2018) a topol (Jaworek et al. 2019b). Obecně platí, že nejlepším ligandem většiny receptorů je *tZ* s disociačními konstantami v řádu jednotek nM. Vysoké afinity k receptorům mají obvykle také *iP* a *TDZ*, následované *tZR* a *mT*. Rozdíl v disociačních konstantách pro *tZ* a *iP*, který představuje jeden až dva řády, je dán možností hydroxylové skupiny postranního řetězce *tZ* interagovat s reziduem Thr294 (Obr. 6; číslování podle AHK4; Hothorn et al., 2011). Ribosidy jsou vždy řádově horšími ligandy než příslušné volné báze a ostatní testované cukerné konjugáty cytokininů se na receptory neváží vůbec.

Doposud byla také popsána řada bodových mutací, které zásadně mění vlastnosti cytokininových receptorů. Již zmíněná mutace *wol* (Thr301 za Ile v sekvenci AHK4) dopomohla ke zjištění, že HK samotné mají fosfatase aktivitu. Jsou schopné defosforylovat HPT, čímž v nepřítomnosti cytokininů vypínají navazující přenos signálu. Mutant *wol* však zůstává ve stavu aktivní fosfatasy neustále a snižuje tak odezvu



**Obrázek 6** Aminokyselinová rezidua ve vazebném místě AHK4 a jejich interakce s molekulou *iP* (A) a *tZ* (B). Obrázek byl převzat z publikace Hothorn et al. (2011).

rostlinných buněk na cytokininy (Mähönen et al. 2006a). Několik dalších známých mutací potom způsobuje permanentní aktivaci receptorů. Zejména se jedná o záměny v intracelulární oblasti mezi posledním transmembránovým helix a DHPt doménou, kterých bylo u AHK4 identifikováno celkem pět (Miwa et al. 2007). Dále byly popsány například mutace v genech pro AHK2 a AHK3, označované jako *represory cytokininové deficiencie* (*rock*). Také mutanti *rock2* a *rock3* se vyznačují konstitutivní aktivací receptoru, avšak minimálně u obou variant *rock3* se zodpovědné záměny nacházejí v CHASE doméně (Bartrina et al. 2017).

Jedna z aktuálně diskutovaných oblastí cytokininového výzkumu se týká subcelulární lokalizace receptorů, která není uspokojivě objasněna (Romanov et al. 2018). Původní bioinformatická predikce ukazovala na jejich lokalizaci převážně v plasmatické membráně (Ueguchi et al. 2001), což bylo podpořeno snímky protoplastů exprimujících AHK3 fúzané s GFP (Kim et al. 2006). O několik let později však byla publikována trojice článků, které různými metodami včetně fúze s GFP demonstrují, že majorita AHK3, AHK4 a také receptoru z kukuřice je lokalizována v membráně endoplasmatického retikula (Lomin et al. 2011; Wulfetange et al. 2011; Caesar et al. 2011). K podobnému závěru dochází také práce na receptorech z jabloně a rýže (Daudu et al. 2017; Ding et al. 2017) a lokalizaci v membráně endoplasmatického retikula dále podporují pH optima některých receptorů stanovená v neutrální oblasti (cytosol), zatímco pH apoplastu je mírně kyselé (Romanov et al. 2006; Lomin et al. 2015).

Receptory však interagují s řadou proteinů zapojených do vnitrobuněčného transportního systému a změna jejich lokalizace může sloužit k regulaci signalizace (Dortay et al. 2008). Odstranění receptorů z plasmatické membrány může snížit citlivost buňky k cytokininům a endoplasmatické retikulum může sloužit jako pohotovostní zásoba receptorů (Kang et al. 2017). Tento model podporují experimenty s transportérem AtPUP14, upozorňující na možný zásadní vliv cytokininové signalizace zahájené na plasmatické membráně při vývoji některých rostlinných orgánů (Zürcher et al. 2016). Nejnovější a zatím nepublikovaná data kolegů z Centra regionu Haná (PřF UP) a Rakouského Institutu vědy a technologií (IST Austria) týkající se lokalizace AHK4 pomocí fluorescenčně značených cytokininů pak dokazují jeho rozdílnou distribuci v obou diskutovaných membránách u různých typů buněk (Kubiasová et al. 2019).

Bez ohledu na lokalizaci receptorů je navazujícím článkem cytokininové signalizace HPt. U *Arabidopsis* se jedná o skupinu celkem šesti malých proteinů, z nichž však jeden označovaný jako *pseudo-AHPt* (také AHPt6) postrádá His reziduum kritické pro přenos fosfátu (Suzuki et al. 2000). První tři z příslušných genů přitom byly klonovány a charakterizovány dvěma skupinami nezávisle na sobě (Miyata et al. 1998; Suzuki et al. 1998). Pomocí fúze s GFP se také podařilo prokázat, že AHPt slouží jako člunek mezi cytosolem a buněčným jádrem (Hwang a Sheen, 2001). *Arabidopsis* s vyřazenými geny pro jednotlivé AHPt jakož i jejich kombinace včetně pětinasobného mutantu byly použity pro zhodnocení významu AHPt *in vivo* (Hutchison et al. 2006). Ve většině případů mají na přenos signálu pozitivní vliv a jejich funkce se částečně překrývají. Jednonásobní mutanti vykazovali fenotyp nerozlišitelný od WT, nejvýraznější rozdíly byly pozorovány u mutantních rostlin zahrnujících *ahpt2 3 5*. Pětinasobný mutant měl menší nadzemní část než WT, nejintenzivnější negativní vlivy byly pozorovány u délky kořene, vývoje cévních svazků, plodnosti a velikosti semen (Hutchison et al. 2006). Zajímavostí je, že S-nitrosylace určitého Cys rezidua v sekvenci AHPt1, které je přítomno také u dalších AHPt, vede ke snížené schopnosti přenášet fosfát na navazující RR. Na této úrovni přenosu cytokininového signálu tak může docházet k integraci se signalizací stresu prostřednictvím oxidu dusnatého (Feng et al. 2013).

Poslední z této skupiny proteinů, AHPt6, je nejen neschopen přenášet fosfát, ale navíc inhibuje i ostatní AHPt a slouží tak jako negativní regulátor cytokininové signalizace. Exogenní aplikace cytokininů pak vede ke snížení exprese AHPt6 v kořeni (Mähönen et al. 2006b), kde se tento protein podílí na regulaci diferenciaci buněk zakládajících cévní svazky (Mähönen et al. 2006b; Bishopp et al. 2011). Mezi další známé procesy, na jejichž regulaci se AHPt6 podílí, patří zakládání laterálních kořenů (Moreira et al. 2013). Periodický nárůst jeho exprese v určitých časových intervalech navázaných na auxinovou signalizaci v apikálním meristému nadzemní části rostliny také napomáhá udržovat vzor pravidelného zakládání listových primordií (Besnard et al. 2014).

Na konci transdukce cytokininového signálu figurují RR rozdělované na typ A, B a případně ještě typ C, které se liší přítomnými doménami a také funkcí. RR typu B obsahují přijímací doménu a DNA vázící doménu jsou aktivovány přenosem fosfátu z HPt na konzervované Asp reziduum a následně fungují jako transkripční faktory (Imamura et al.



1999; Sakai et al. 2001; Hosoda et al. 2002). Genom *Arabidopsis* obsahuje celkem 11 genů pro RR typu B, které lze dále rozdělit do tří podskupin, a jejich exprese v různých částech rostliny se do značné míry překrývá (Mason et al. 2004). Největší z těchto podskupin zahrnuje ARR1-2 a ARR10-12, které se pro odezvu na cytokinový signál zdají být nejvýznamnější, jak dokládají studie jejich „loss-of-function“ nebo nadexprimujících mutantů *Arabidopsis* (Hwang a Sheen, 2001; Sakai et al., 2001; Imamura et al., 2003; Argyros et al., 2008). Například pod kontrolou ARR10 je potenciálně až několik set genů rozmístěných napříč genomem (Zubo et al. 2017).

Jednou ze skupin genů velmi rychle přepisovaných v důsledku aktivace RR typu B po percepci cytokininů jsou také RR typu A (Brandstatter a Kieber, 1998; D'Agostino et al., 2000; Rashotte et al., 2003). *Arabidopsis* jich obsahuje celkem 10 a jejich sekvence je kratší než je tomu u RR typu B, jelikož postrádají DNA vazebnou doménu (D'Agostino et al., 2000). Fungují jako negativní zpětnovazebné regulátory cytokininové signalizace s částečným překryvem jejich exprese napříč rostlinou (Hwang a Sheen, 2001; To et al., 2004), která je dále regulována například auxiny. Tato regulace přitom může být orgánově specifická. Zatímco exprese některé RR typu A je v reakci na auxiny v apikálním meristému nadzemní části rostliny potlačena (Leibfried et al. 2005), tytéž geny jsou v apikálním meristému kořene auxiny naopak indukovány (Müller a Sheen, 2008).

Přesný mechanismus účinku RR typu A doposud není objasněn. Rozsáhlá studie interakcí jednotlivých proteinů zapojených do TCS cytokininové signalizace prokázala jejich interakce s HPt, ale nikoliv s RR typu B, což naznačuje interferenci s přenosem signálu na úrovni HPt (Dortay et al. 2006). Defosforylace RR typu A je přibližně desetkrát rychlejší než u typu B (Asakura et al. 2003), mohou tedy efektivně kompetovat o přenos fosfátu z HPt. Zároveň jsou však RR typu A fosfátem samy aktivovány a stabilizovány, načež mohou interagovat s dalšími proteiny nezbytnými pro regulaci cytokininové signalizace. Oba popsané způsoby negativní regulace, tedy kompetice s RR typu B nebo aktivace dalších regulačních proteinů, se přitom nevylučují (To et al. 2007).

Někdy jsou také rozlišovány RR typu C, které jsou strukturně blízké RR typu A a v *Arabidopsis* se nacházejí dva homology (ARR22 a ARR24). Jejich exprese však není indukována cytokininy a minimálně v případě ARR22 je za normálních podmínek téměř výhradně omezená na reprodukční orgány. Nadexprimování ARR22 ve zbytku rostliny

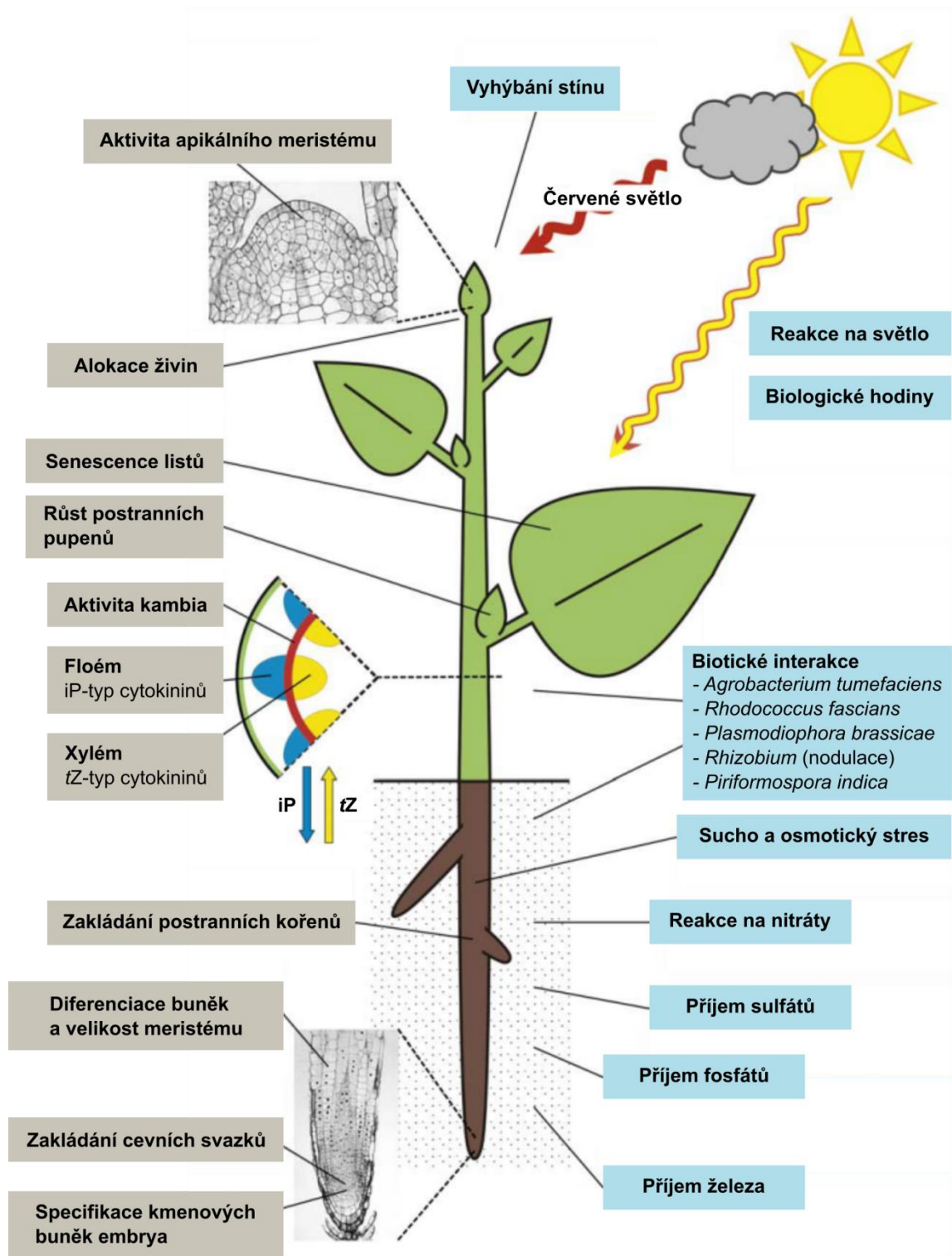
vede k fenotypu podobnému jako u receptorového mutanta *wol* – narušení organizace cévních svazků a zakrnělý vzrůst (Kiba et al. 2004). Byla prokázána interakce ARR22 s některými AHPt a předpokládá se, že vůči nim mají fosfatasovou aktivitu (Horák et al. 2008). ARR22 se může pozitivně podílet na odezvě k abiotickému stresu, ale funkce RR typu C zůstává z velké části nejasná (Kang et al. 2013).

Genom *Arabidopsis* dále kóduje skupinu proteinů příbuzných RR, označovaných jako *pseudo*-RR, které však postrádají konzervované Asp reziduum nezbytné pro příjem fosfátu. Pětice z nich je součástí mechanismu rostlinných biologických hodin. Dochází k periodickému střídání jejich exprese v důsledku vzájemné zpětnovazebné regulace, která je navíc synchronizována s fotoperiodou prostřednictvím fytochromů (Matsushika et al. 2000; Strayer et al. 2000; Makino et al. 2001).

### **3.6 Fyziologické funkce cytokininů**

Závěrečná kapitola teoretické části disertační práce, shrnující fyziologické funkce cytokininů v rostlinách (Obr. 7), je psána pouze stručně, neboť studium této problematiky nebylo cílem práce. Regulace růstu, vývoje a reakcí rostlin na vnější prostředí a stresové faktory je navíc velmi komplexní záležitost vyžadující souhru působení cytokininů s ostatními fytohormony, jako jsou auxiny, ethylen, giberiliny, strigolaktony a další (El-Showk et al. 2013). V posledních letech také přibývá poznatků o možných ekologických funkcích cytokininů (Stirk and Staden 2010) zejména při interakci s mikroorganismy a hmyzem (Robischon 2015).

Objev cytokininů souvisel s hledáním faktoru schopného podněcovat dělení rostlinných buněk (Miller et al. 1955). Stimulují přechod z  $G_1$  do S fáze (Riou-Khamlichi et al. 1999) a zejména z  $G_2$  do M fáze buněčného cyklu (Zhang et al. 1996), významně se proto podílejí na regulaci aktivity meristematických buněk. Jedním z genů indukovaných cytokininy je *WUSCHEL* (Zubo et al. 2017), kódující transkripční faktor klíčový pro udržení kmenových buněk apikálního meristému v nediferenciovaném stavu (Mayer et al. 1998). *WUSCHEL* zároveň funguje jako transkripční represor RR typu A, čímž brání zpětnovazebné inhibici cytokininové signalizace (Leibfried et al. 2005). Na udržení apikálního meristému se dále podílí transkripční faktor STM (Endrizzi et al. 1996), který je také indukován cytokininy (Rupp et al. 1999) a současně je transkripčním aktivátorem exprese IPT (Yanai et al. 2005).



**Obrázek 7** Přehled fyziologických funkcí a procesů, do jejichž regulace jsou zapojeny cytokininy. Obrázek byl převzat z publikace Werner a Schmölling (2009) a upraven.

U rostlin rýže s vyřazenými *LOG* geny docházelo k předčasné ztrátě aktivity apikálního meristému a defektech při vývoji květů (Kurakawa et al., 2007).

Zatímco růst nadzemní části rostliny je cytokininů stimulován, jejich vliv na kořenový systém je opačný. Snížení hladiny cytokininů způsobené nadexpresí *AtCKX* vedlo ke zvýšení počtu meristemických buněk v kořeni, který byl v porovnání s WT delší a rozvětvenější (Werner et al., 2001). Pro regulaci dělení buněk kořenového meristému a zakládání postranních kořenů je stěžejním lokální koncentrace auxinů, kterou ovlivňuje jejich polární transport prostřednictvím PIN proteinů (Blilou et al. 2005). Cytokininů aktivují expresi *SHY2*, který kóduje transkripční represor *PIN* genů (Moubayidin et al. 2010), a v důsledku tím podporují diferenciaci buněk a negativně ovlivňují velikost kořenového meristému (Dello Ioio et al. 2007). Vliv na rovnováhu mezi dělením a diferenciací buněk v oblasti meristému má i transkripční faktor PHB, který je aktivátorem *AtIPT7*, ale v odezvě na cytokininů zároveň dochází k negativní zpětnovazební regulaci jeho exprese (Dello Ioio et al. 2012). Cytokininů také narušují auxinový gradient v oblasti zakládání a postranních kořenů, čímž inhibují jejich růst (Laplaze et al. 2007). Souhra působení cytokininů a auxinů dále řídí například gravitropismus kořene (Pernisová et al. 2016) a v ranných fázích embryogeneze pak specifikaci kmenových buněk, které později utvářejí kořenový meristéum (Müller a Sheen, 2008).

Koordinace auxinové a cytokininové signalizace je nezbytná i pro udržení apikální dominance. Auxiny produkované v oblasti apikálního meristému nadzemní části inhibují lokální biosyntézu cytokininů v postranních pupenech. Po odstranění apexu dochází k uvolnění inhibice a cytokininů následně stimulují růst postranních větví (Tanaka et al. 2006). Cytokininů regulují také aktivitu kambia a radiální růst rostlin. Topoly nadexprimující *CKX* měly snížený počet buněk kambia a tenčí stonky než WT (Nieminen et al. 2008). Podobný efekt byl pozorován u *atipt1 3 5 7* mutantů *Arabidopsis*, přičemž naroubování nadzemní části mutantní rostliny na kořeny WT a *vice versa* obnovilo aktivitu kambia na normální úroveň (Matsumoto-Kitano et al. 2008). Diferenciace buněk při zakládání cévních svazků v kořeni je dalším procesem pod kontrolou cytokininové signalizace (Mähönen et al. 2006b; Yokoyama et al. 2007).

Schopnost exogenně aplikovaných cytokininů oddalovat ztrátu chlorofylu a senescenci listových explantátů byla popsána brzy po objevu kinetinu (Richmond a Lang, 1957).

Exprese *IPT* v listech tabáku pod kontrolou senescenční specifického promoteru vedla k inhibici senescence a prodloužení doby, po kterou byly listy fotosynteticky aktivní (Gan a Amasino, 1995). Podstatnou částí těchto antisenescenčních účinků cytokininů je jejich vliv na alokaci asimilátů prostřednictvím regulace aktivity invertasy štěpící sacharosu (Balibrea Lara et al. 2004; Werner et al. 2008). Cytokininů dále regulují expresi genů souvisejících s metabolismem chlorofylu a s fotosystémem II, což má s oddálením senescence nejspíš také souvislost (Talla et al., 2016). Antisenescenční působení cytokininů navíc zvyšují odolnost rostlin k suchu (Rivero et al. 2007). Cytokininů také negativně regulují signalizaci kyseliny abscisové v odezvě na osmotický stres (Tran et al. 2007).

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst rostlin je světlo a i reakce na něj jsou propojeny s cytokininovou signalizací. Fytochrom B, který slouží jako senzor světla v červené a vzdálené červené části spektra, je stabilizován v aktivní formě interakcí s ARR4 a zároveň indukuje jeho expresi (Sweere et al. 2001). Cytokininů aktivovaný ARR4 prostřednictvím fytochromu B mimo jiné zpožďuje fázi rostlinného cirkadiálního rytmu (Hanano et al. 2006). Exprese CKI1 je pak v závislosti na světle pod kontrolou signalizace fytochromu A, což reguluje růst a vývoj hypokotylu (Dobisová et al. 2017). Poměr dopadajícího červeného a vzdáleného červeného světla dále ovlivňuje dělení buněk v listových primordiích. Při zastínění rostliny vzroste podíl vzdáleného červeného světla, což vede k auxiny indukované expresi *AtCKX6*. Důsledkem je zvýšená degradace cytokininů v listových primordiích a zastavení jejich vývoje ve prospěch dlouhivého růstu (Carabelli et al. 2007). Dalším prvkem propojujícím cytokininovou signalizaci a fotoreceptory je transkripční faktor HY5 působící inhibici růstu hypokotylu. HY5 je na úrovni proteinu stabilizován v odezvě na cytokininů a modré světlo, jehož percepci zajišťují kryptochromy (Vandenbussche et al. 2007).

Spojitost mezi cytokininů a dostupností dusíku je známa dlouho (von Wagner a Michael, 1971). Příklad anorganického dusíku do pěstebního média vede k nárůstu koncentrace cytokininů v kořeni a xylémové šťávě (např. Takei et al., 2001b), což ovlivňuje růst rostlin a řadu vývojových procesů (Gu et al. 2018). Cytokininů se však podílí i na zprostředkování reakcí rostlin na další minerální živiny. Společně s auxiny a kyselinou abscisovou regulují expresi fosfátových transportérů (Ribot et al. 2008). Pod cytokininovou kontrolou je také

příjem sulfátů (Maruyama-Nakashita et al. 2004) a železa (Séguéla et al. 2008), působí represi transkripce příslušných transportérů a reduktasy železitých chelátů v kořeni.

Poměrně rozsáhlým tématem je úloha cytokininů při interakci rostlin s mikroorganismy a houbami, ať už patogenními nebo symbiotickými. Nejlépe prostudovaným příkladem je infekce rostlin bakterií *A. tumefaciens*, která během tvorby hálek integruje do rostlinného genomu část svého Ti-plasmidu kódující mimo jiné IPT. Prostřednictvím produkce *iZ* v plastidech pak ovlivňuje dělení hostitelských buněk (Sakakibara et al. 2005). Podobnou strategii využívá bakterie *R. fascians*, která během infekce vylučuje směs několik cytokininů (Pertry et al. 2009). Parazitický prvok *Plasmodiophora brassicae*, který napadá kořeny brukvovitých rostlin, v infikovaných pletivech potlačuje expresi řady genů souvisejících s cytokininovým metabolismem a signalizací (Malinowski et al. 2016). Cytokinininy jsou stěžejní také pro tvorbu kořenových hlízek u luštěnin, bez kterých nejsou symbiotické bakterie druhu *Rhizobium* schopné fixovat dusík (Murray et al. 2007), nebo například pro kolonizaci kořenů endofytní symbiotickou houbou *Piriformospora indica* (Vadassery et al. 2008).

## 4 SEZNAM PUBLIKACÍ

### Publikace relevantní pro disertační práci

**Jaworek P**, Kopečný D, Zalabák D, Šebela M, Kouřil Š, Hluska T, Končítíková R, Podlešáková K, Tarkowski P (2019) Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta* 250:229–244. **IF** = 3.06

**Jaworek P**, Tarkowski P, Hluska T, Kouřil Š, Nisler J, Kopečný D (2019) Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins. *Planta*, přijato k publikování dne 13.10.2019 **IF** = 3.06

### Další spoluautorské publikace

Šmehilová M, Galuszka P, Bilyeu KD, **Jaworek P**, Kowalska M, Šebela M, Sedlářová M, English JT, Frébort I (2009) Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *J Exp Bot* 60, 2701–2712. **IF** = 5.36

Mortier V, Wasson A, **Jaworek P**, De Keyser A, Decroos M, Holsters M, Tarkowski P, Mathesius U, Goormachtig S (2014) Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytol* 202:582–593. **IF** = 7.30

Motte H, Galuszka P, Spíchal L, Tarkowski P, Plíhal O, Šmehilová M, **Jaworek P**, Vereecke D, Werbrouck S, Geelen D (2013) Phenyl-adenine, identified in a LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS4-assisted chemical screen, is a potent compound for shoot regeneration through the inhibition of CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE Activity. *Plant Physiol* 161:1229–1241. **IF** = 6.31

Tarkowski P, Floková K, Václavíková K, **Jaworek P**, Raus M, Nordström A, Novák O, Doležal K, Šebela M, Frébortová J (2010) An improved in vivo deuterium labeling method for measuring the biosynthetic rate of CKs. *Molecules* 15:9214–9229. **IF** = 3.06

## 5 MATERIÁL A METODY

### 5.1 Biologický materiál

#### *Populus × canadensis (cv. Robusta)*

Mladé stromky byly zakoupeny od Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti (VÚLHM) - Výzkumná stanice Kunovice. Biologický materiál z dospělého topolu, který byl určen dendrologem VÚLHM, byl sbírán v Olomouci (GPS souřadnice: 49°35'44"N, 17°13'39"E). Kalusovou kulturu topolu odvodila a poskytla skupina RNDr. Jany Malé, CSc. z VÚLHM (Jíloviště). Tato kultura byla pěstována v médiu podle Murashige a Skooga s vitamíny (MS; Duchefa) pH 5,7 doplněném o 20 g l<sup>-1</sup> sacharosy, 10 mg l<sup>-1</sup> glutaminu, 2 mg l<sup>-1</sup> glycinu, 0,2 mg l<sup>-1</sup> tZ (Duchefa) a 0,1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny (Duchefa). Bylo používáno také médium ztužené 7 g l<sup>-1</sup> plant agaru (Duchefa). Kultivace probíhala za třepání (120 rpm) při teplotě 23/21 °C (den/noc) a 16 h fotoperiodě (140 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), pasážování bylo prováděno každé dva týdny.

Pro odvození *in vitro* kultury *Populus tremula × Populus alba* byly použity mladé větve ořezané ze stromu v období vegetačního klidu. Po přesunu do nádoby s vodou umístěné v růstové komoře došlo k přerušení dormance pupenů a začátku růstu nových výhonků. Ty byly z mateřské větve ustřiženy, když dosahovaly délky několika cm a povrchově vysterilizovány 70 % ethanolem po dobu 15 minut. Po oplachu sterilní vodou (5x) z nich byly odstraněny listy a výhonky byly rozděleny na segmenty (~ 1 cm) obsahující vždy jeden axilární pupen. Segmenty byly v bazipetální orientaci zasazeny do McCownova média pro dřevnaté rostliny (Duchefa) pH 5,8 doplněném o 20 g l<sup>-1</sup> sacharosy a ztuženém 7 g l<sup>-1</sup> plant agaru. Po zakořenění byla část jejich listů skalpelem nařezána na kousky, které byly přeneseny na kalus indukující médium – MS médium pH 5,8 s 20 g l<sup>-1</sup> sacharosy, 1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny a 0,02 mg l<sup>-1</sup> kinetinu ztužené 7 g l<sup>-1</sup> plant agaru. Odvozené kalusy byly přeneseny do téhož média bez agaru a kultivovány na třepačce (120 rpm), kde docházelo k jejich rozpadu postupně až na úroveň buněčné suspenze.



### ***Arabidopsis thaliana***

Semena divokého typu (WT) *Arabidopsis* ekotypu *Columbia* poskytl kolega Mgr. David Zalabák, Ph.D., do WT rostlin byly transformovány adenylátové *PcIPT*. Semena dvojitého mutanta *atipt 2 9* poskytl prof. Tatsuo Kakimoto (Osaka University, Japonsko), do těchto rostlin byla transformována tRNA *PcIPT9*. Transgenní rostliny *Arabidopsis* exprimující topolové *PcIPT* fúznové s Myc tagem pod kontrolou estradiolem indukovatelného promoteru připravil Mgr. David Zalabák, Ph.D. (Jaworek et al. 2019a), který také ověřil přítomnost transgenní kazety v T1 generaci pomocí PCR.

Povrchová sterilizace semen byla prováděna 70% ethanolem po dobu 3 min a následně 5% (w/w) roztokem chlornanu sodného po dobu 10 min, nakonec byla semena 5x opláchnuta sterilní vodou. První týdny kultivace vždy probíhaly na MS médium pH 5,7 doplněném o 10 g l<sup>-1</sup> sacharosy, 0,5 g l<sup>-1</sup> 2-(N-morfolino)ethanesulfonové kyseliny (Sigma-Aldrich) a zahuštěno 7 g l<sup>-1</sup> plant agaru (Duchefa). Selekčního médium navíc obsahovalo hygromycin B (Sigma-Aldrich) v koncentraci 30 mg l<sup>-1</sup>. Klíčení bylo synchronizováno umístěním semen na MS médium do lednice na 2-3 dny, po kterých byly misky přesunuty do růstové komory při teplotě 23/21 °C (den/noc) a 16 h fotoperiodě (140 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Při selekci homozygotních linií byly v T2 generaci vybrány transgenní rostliny, kterých na selekčním médiu po třech týdnech přeživalo 75 %. Tyto rostliny měly transgenní kazetu v genomu integrovanou právě jednou. Z každé z těchto linií bylo minimálně 10 semenáčků přesazeno do květináčů a umístěno do plastových tubusů, aby se zamezilo vzájemnému opylení sousedních rostlin. Po dozrání byla semena individuálních rostlin opět vyseta na selekční médium, v případě homozygotních linií přeživalo 100 % semenáčků T3 generace. Dále byly používány dvě nezávislé homozygotní linie pro každou *PcIPT*.

Exprese *PcIPT* byla indukována postřikem 5 μM 17-β-estradiolu (Sigma-Aldrich) ve vodném roztoku 0.1% Tweenu 20 aplikovaným na tři týdny staré semenáčky. Celé rostliny, ošetřené estradiolem i kontrolní, byly po 24 h zamrazeny v kapalném dusíku a před další analýzou skladovány při -80 °C. Pro pozorování fenotypu byly semena transgenních rostlin vysazena na čtvercové misky a pěstovány v horizontální poloze. Kontrolní skupiny byly kultivovány na výše popsaném MS médiu, které v případě indukovaných skupin navíc obsahovalo 5 μM estradiol. Fenotyp byl zaznamenán 12 dní po vyklíčení semen.

### ***Ostatní organismy***

Získání *Agrobacterium tumefaciens* (kmen GV3103) bylo zprostředkováno Mgr. Danuší Tarkowskou, Ph.D. (Institut experimentální botaniky, Akademie věd České republiky). Bakterie byly kultivovány při 30 °C na třepačce (160 rpm) v LB médiu. Kmeny D5, D188 a MTR2 bakterie *Rhodococcus fascians* byly poskytnuty Dr. Danny Vereecke (toho času působící na Ghent University, Belgie). Byly kultivovány při 28 °C a 160 rpm v médiu z kvasničného extraktu (*yeast extract broth*) a pro indukci produkce cytokininů převedeny do minimálního média MinA (Temmerman et al. 2000).

Suspenzní buněčná kultura *Chenopodium rubrum* byla získána od skupiny prof. Dr. Erwina Becka (Universität Bayreuth, Německo) a kultivována ve stejném médiu a pěstebním systému se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> jako v původní práci (Hüsemann and Barz 1977). Kultivace probíhala za třepání (120 rpm) při teplotě 23/21 °C (den/noc) a 16 h fotoperiodě (140 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Pasážování bylo prováděno vždy po čtyřech týdnech. Kultura *Protococcus viridis*, respektive *Chlorella sorokiniana* byla poskytnuta prof. Dr. Vince Ördögem, CSc. (University of West Hungary, Sopron, Maďarsko) a kultivována dle jeho doporučení v kapalném médiu obsahujícím stejné makroprvky jako Tamiya médium (Hase et al. 1957) a mikroprvky používané u Zehnderova média (Hughes et al. 1958). Rychlost třepání, teplota a fotoperioda byla stejná jako pro kulturu *Ch. rubrum*, pasážování bylo prováděno každé tři týdny.

### **5.2 Metody**

Disertační práce nebyla zaměřena na vývoj nových metod, tato kapitola je proto koncipována pouze jako stručný přehled. Sekvence primerů a prób použitých pro klonování topolových *IPT* (*PcIPT*) a housekeeping genů *UBQ1* a *TUA2* stejně jako seznam aminokyselinových sekvencí zahrnutých do fylogenetické analýzy je uveden v publikaci Jaworek et al. (2019a). Analogické informace pro topolové *HK* (*PcHK*) obsahuje publikace Jaworek et al. (2019b). Detailněji je rozebrána zejména heterologní exprese *PcIPT* v *E. coli* a následná snaha o purifikaci rekombinantních proteinů.

### ***Purifikace a analýza cytokininů***

Volné cytokininy byly izolovány a přečištěny podle Åstot et al. (2000) s drobnými úpravami (Novák et al. 2003). Rostlinná pletiva (100 mg) byla homogenizována v kapalném dusíku a extrahována 1 ml Bieleského roztoku (Bieleski 1964) přes noc

při -18 °C spolu s přidavkem 3 pmol deuterovaných standardů cytokininů (OlChemIm, Olomouc, CZ). Cytokininy byly přečištěny pomocí extrakce na pevné fázi, katex a C18 reverzní fáze (Agilent Technologies), a následně imunoafinitně. Vzorky byly koncentrovány za sníženého tlaku a analyovány UHPLC-MS/MS (LCMS-8050, Shimadzu) podle Novák et al. (2008). Data byla zpracována metodou isotopového ředění (Rittenberg a Foster, 1940).

Izolace tRNA byla provedena metodou založenou na ošetření extraktu roztokem fenolu a *m*-kresolu s následným oddělením DNA a ostatních typů RNA postupnou precipitací (Maaß a Klämbt, 1981), modifikována podle Stirk et al. (2012). tRNA izolovaná ze 100 mg rostlinného pletiva byla hydrolyzována 2 M KOH a nukleotidy byly ošetřeny alkalickou fosfátasou FastAP (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly po přidavku deuterovaných standardů cytokininů přečištěny extrakcí na pevné fázi (C18), koncentrovány za sníženého tlaku a analyovány UHPLC-MS/MS. Cytokininy byly vždy kvantifikovány nejméně ve třech technických replikátech.

#### ***Extrakce a analýza fenolických kyselin***

Izolace fenolických kyselin ze tří replikátů (100 mg) v kapalném dusíku homogenizovaných rostlinných pletiv byla provedena podle (Ayaz et al. 2005). Ke vzorkům extrahovaným 80% methanolem byly přidány deuterované standardy kyseliny 4-hydroxybenzoové a salicylové (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA). Postupně byly odděleny frakce volných fenolických kyselin, jejich esterů, glykosidů a v methanolu nerozpustných konjugátů, které byly podrobeny kyselé či alkalické hydrolyze a vytřepány do diethyletheru. Vzorku byly odpařeny do sucha, rozpuštěny v mobilní fázi a analyovány UHPLC-MS/MS (LCMS-8050, Shimadzu) podle Gruz et al. (2008). Data byla zpracována metodou isotopového ředění (Rittenberg a Foster, 1940).

#### ***Molekulární klonování *PcIPT* a *PcHK****

Rostlinná RNA byla extrahována kitem RNAqueous a ošetřena Turbo DNAsou (Thermo Fisher Scientific). Přepis do cDNA byl proveden reverzní transkriptasou ProtoScript II (NEB) nebo RevertAid H- (Thermo Fisher Scientific). Kódující sekvence většiny genů byly amplifikovány polymerasou Q5 (NEB) z cDNA, v případě *PcIPT7a* a *PcIPT7b* byla jako templát použita genomická DNA izolovaná kitem DNeasy Plant (Qiagen). Všechny sekvence byly následně klonovány do vektoru Zero Blunt (Thermo Fisher Scientific),

transformovány do kompetentních buněk *E. coli* NEB-5 $\alpha$  (*PcIPT* a housekeeping geny) nebo NEB-10 $\beta$  (*PcHK*) pro produkci plasmidů a sekvenovány (SeqMe, Dobříš, CZ). Intron ze sekvencí *PcHK7a* a *PcHK7b* byl odstraněn PCR amplifikací celých zbývajících částí genů a vektorů, které byly opětovně ligovány T4 DNA ligasou (NEB). Sekvence genů *PcIPT5a*, *PcIPT6a*, *PcIPT7a*, *PcHK2*, *PcHK2*, *PcHK3a*, *PcHK3b* a *PcHK4a* byly navíc syntetizovány s optimalizací kodonu pro expresi v *E. coli* (GenScript, Piscataway, NJ, US).

*PcIPT* byly následně klonovány do expresních vektorů pCDFDuet-1, pETDuet-1 nebo pET-28a (Merck) prostřednictvím restrikčních míst obsažených v sekvencích primerů, kterými byly příslušené geny amplifikovány z cDNA nebo genomické DNA. Sekvence *PcIPT* byly na N-konci doplněny o 6x His-tag. Pro produkci rekombinantních proteinů byly použity T7 expresní buňky *E. coli* (NEB). *PcHK* byly dále klonovány do vektoru pINIII $\Delta$ EH a exprimovány v *E. coli* kmene KMI001, které byly použity pro vazebné a kompetiční testy. Vektor pINIII $\Delta$ EH a *E. coli* KMI001 poskytl kolega Mgr. David Zalabák, Ph.D.

#### ***Analýza genové exprese PcIPT a PcHK***

Vzorky cDNA pro analýzu genové exprese byly získány stejným postupem jako při molekulárním klonování. RNA ze dvou biologických replikátů byla přepsána ve dvou nezávislých reakcích. Každý vzorek cDNA byl analyzován qPCR v triplicátu na přístroji QuantStudio 5 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific). Byly použity dvojité značené TagMan próby nesoucí fluorescenční značku 6-karboxyfluorescein (FAM) a zhášeč tetramethylrhodamin (TAMRA). Pro amplifikaci *PcIPT* byla použita směs polymerasy MyTag Mix (Bioline, Londýn, UK), pro *PcHK* pak Luna<sup>®</sup> Universal Mix (NEB). Plasmidy nesoucí sekvence jednotlivých *PcIPT* a *PcHK* posloužily jako templáty pro ověření PCR účinnosti a specificity příslušných primerů a prób. Hodnoty C<sub>T</sub> („cycle treshold“) byly normalizovány vzhledem k housekeeping genům.

#### ***Fylogenetická analýza a konstrukce modelů struktur PcIPT a PcHK***

Pro zarovnání aminokyselinových sekvencí byl použit server T-Coffee (Notredame et al. 2000) a části sekvencí nevhodné pro fylogenetickou analýzu byly odstraněny pomocí programu GBlocks (Castresana 2000). Fylogenetické stromy byly vypočítány metodou maximální věrohodnosti („maximum likelihood“) na základě LG matrice (Guindon et al. 2010). Statistická pravděpodobnost konkrétního větvení byla určena metodou

„bootstrapping“ s parametrem 1000 opakování. Dříve nepublikované sekvence IPT byly vyhledány algoritmem BLAST v databázi Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>).

Strukturní modely studovaných proteinů z topolu byly zkonstruovány programem Swiss-model (Waterhouse et al. 2018). Templátem pro adenylátové PcIPT byla struktura chmelové IPT (PDB ID = 3A8T; Chu et al., 2010) a pro PcHK struktura CHASE domény AHK4 (PDB ID = 3T4L; Hothorn et al., 2011). Struktury byly superponovány v programu WinCoot v0.8.9.2 (Emsley et al. 2010).

### ***Expresa PcIPT v Escherichia coli a purifikace rekombinantních proteinů***

Expresní buňky T7 nesoucí vektory s *PcIPT* byly kultivovány při 37 °C v LB médiu a indukovány 0,5 mM isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosidem (IPTG; VWR, Lutterworth, UK) přes noc při 20 °C. Ve snaze zvýšit rozpustnost PcIPT byly otestovány různé koncentrace IPTG, kultivační časy a teploty a doplnění média o 1 M sorbitol spolu s 2,5 mM trimethylglycinem (Blackwell a Horgan, 1991). Bakteriální buňky byly rozsuspendovány v 50 mM Tris/HCl pufru obsahujícím 100 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> a inhibitor proteas cOmplete™ (Sigma-Aldrich). pH pufru bylo upraveno podle vypočtených isoelektrických bodů rekombinantních proteinů: pH 7,0 pro PcIPT2/6a/6b/9, pH 8,2 pro PcIPT5a/5b/7a/7b a pH 9,0 pro PcIPT3. Byl otestován také HEPES a K-fosfátový pufr. Vzorky byly lyzovány přístrojem Constant Systems OS (Constant Systems, Daventry, UK) při tlaku 20 kpsi nebo 30 kpsi pro purifikaci rekombinantních proteinů z inkluzních tělísek. Ta byla před dalším zpracováním promyta pufrům obsahujícím navíc 1 M močovinu, 5 % (v/v) glycerolu a 1 % (w/v) Tritonu X-100. Inkluzní tělíska byla solubilizována 6 M močovinou, 6 M guanidinem nebo 2,2% N-lauroylsarkosinem (Sigma-Aldrich).

Buněčný lyzát byl ošetřen DNasou I a RNasou A (Sigma-Aldrich). Purifikace rekombinantních proteinů byla provedena na kobaltových kolonách HisPur (Thermo Fischer Scientific) ekvilibrovaných příslušným pufrům doplněným o 10 mM imidazol a 5% (v/v) glycerol, případně navíc o 6 M močovinu při purifikaci za denaturačních podmínek. Pro eluci byla koncentrace imidazolu zvýšena na 250 mM, vzorky byly následně zakonzentrovány na kolonách Amicon 10 kDA (Merck). V případě PcIPT5a byla také provedena purifikace proteinů vsádkou ze 2 l výchozí bakteriální kultury. Ionty kobaltu (roztok 5 g l<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>) byly sorbovány na sepharosu (Sigma-Aldrich), které byla následně

ekvilibrována 50 mM octanem amonným pH 6,0 obsahujícím 20 mM NaCl. Frakce rozpustných proteinů (30 ml) byla smísena se 60 ml sorbentu. Po 10 min inkubaci na ledu byla sorbentem naplněna chromatografická kolona, vzorek byl promyt a eluován pufrům obsahujícím 250 mM imidazol. Vzorek byl zakoncentrován na 1 ml a inkubován s 100  $\mu$ M amonnou solí DMAPP (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, US) a 100  $\mu$ M ATP (Sigma-Aldrich). Přítomnost produktu enzymatické reakce PcIPT byla ověřena pomocí UHPLC-MS/MS podle Béres et al. (2012).

Pro opětovné skládání denaturovaných proteinů byla vyzkoušena dialýza nebo gelová filtrace. Během dialýzy byly vzorky obsahující chaotropní činidlo postupně přenášeny do pufrů s klesající koncentrací močoviny v průběhu dvou dnů. Gelová filtrace byla provedena na chromatografické koloně naplněné Superdexem 200 (GE Healthcare). Nepřítomnost chaotropního činidla v mobilní fázi měla zajistit opětovné složení PcIPT během jejich průtoku kolonou. Na závěr byla ověřena enzymatická aktivita PcIPT (Béres et al. 2012).

#### ***Western blotting a imunodetekce PcIPT***

Přítomnost a čistota rekombinantních PcIPT po expresi a v průběhu purifikace byla kontrolována pomocí SDS-PAGE s využitím NuPAGE prefabrikovaných gelů (Thermo Fisher Scientific) v prostředí MOPS pufru (3-(N-morfolino)propanesulfonová kyselina). Gely byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue. Proteiny z gelů byly případně blotovány na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu (Millipore) na přístroji Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membrána byla blokována roztokem 2% polyvinylpyrolidonu 40 a 0,1% Tweenu 20 (Sigma-Aldrich) v PBS pufru, který sloužil také k aplikaci protilátek a promývání membrány. Následovala 1 h inkubace s 2500x ředěnou myší monoklonální protilátkou proti His-tagu (Thermo Fisher Scientific; katalogové číslo MA1-21315) a promytí membrány. Jako sekundární protilátka byla použita 10000x ředěná kozí protilátka proti myší IgG (H+L) konjugovaná s alkalickou fosfatase (Life Technologies; katalogové číslo A16069). Proteiny byly vizualizovány roztokem nitrotetrazoliové modři a 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu (NBT/BCIP; Roche). Imunohistochemická detekce PcIPT po expresi v *Arabidopsis* probíhala analogicky s tím rozdílem, že primární protilátkou byla 5000x ředěná myší monoklonální protilátka anti-Myc-tag klon 4A6 (Merck; katalogové číslo 05–724).

### ***Vazebné a kompetiční testy PcHK***

Vazba cytokininů k PcHK byla studována s využitím živých buněk *E. coli* KMI001 exprimujících jednotlivé receptory podle Romanov et al. (2005, 2006) s drobnými úpravami (Kuderová et al. 2015). Bakteriální buňky byly kultivovány v M9 minimálním médiu doplněném o 0.1% (w/v) hydrolyzát kaseinu, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ampicilinu a 100  $\mu\text{M}$  IPTG při 25 °C přes noc na OD<sub>600</sub> 0,7-0,8. Následovala 30 min (4 °C) inkubace 1 ml kultury s [<sup>3</sup>H]-*tZ* (Isotopová laboratoř Ústavu experimentální botaniky AVČR, Praha, CZ). Vzorky obsahující nadbytek neznačeného *tZ* byly použity jako negativní kontrola pro odlišení nespecifické vazby v důsledku vytěsnění radiolignadu. Po centrifugaci byl bakteriální pelet rozsuspendován v 1 ml kapalného scintilátoru a analyzován na scintilačním počítači Hidex 300 SL (Hidex, Turku, Finsko). Průměrná hodnota  $K_D$  byla stanovena pomocí Scatchardovy analýzy (Scatchard 1949) v programu GraphPad Prism 5.1 (<http://www.graphpad.com/>). Stanovení afinity cytokininů (OlChemIm, Olomouc, CZ) probíhalo na základě jejich kompetice s [<sup>3</sup>H]-*tZ* při pH 7,0. Cytokininy byly testovány v rozmezí koncentrací od 0,01 nM do 10  $\mu\text{M}$  a koncentrace radioligandu byla 2,5 nM pro PcHK2, PcHK3a a PcHK3b nebo 5 nM pro PcHK4a a PcHK4b. Maximální vazba [<sup>3</sup>H]-*tZ* byla ověřena za přítomnosti 0,1% dimethylsulfoxidu namísto kompetitoru.

pH optimum PcHK bylo stanoveno po rozsuspendování bakteriálních buněk v M9 médium obsahujícím 10x menší množství fosfátů a následném smísení kultur s MES (2-(N-morfolino)ethanesulfonová kyselina) nebo MOPS pufrů v rozmezí pH od 5,5 do 8,0 na jejich 100 mM finální koncentraci. Stabilita ribosidů v průběhu inkubace byla testována s využitím iP nebo iPR, jejichž koncentrace byla 25 nM pro PcHK2, 900 nM pro PcHK3b a 125 nM pro PcHK4a. Jako pozitivní kontrola hydrolyzy iPR byly použity vzorky inkubované navíc s kukuřičnou NRH (Kopečná et al. 2013) po dobu 30 minut při 4 °C nebo za laboratorní teploty.

### ***Receptorový aktivační test***

Schopnost PcHK fosforylovat navazující fosfotransferový protein bakteriálního TCS (Takeda et al. 2001) byla ověřena stanovením aktivity  $\beta$ -galaktosidasy podle Spíchal (2011). Bakteriální kultury exprimující *PcHK* byly naředěny čerstvým médiem obsahujícím 100  $\mu\text{M}$  IPTG v poměru 1:100 pro *PcHK2*, 1:5 pro *PcHK3a*, 1:500 pro *PcHK3b* a 1:5 pro *PcHK4a* a *PcHK4b*. Tyto prekultury byly rozděleny na dvě části, ke kterým byl přidán buď

dimethyldulfoxid (kontrola), nebo *tZ* na 1  $\mu$ M finální koncentraci. Vždy tři technické replikáty byly kultivovány v 96-jamkové destičce 18 h při 25 °C na třepačce. Následně bylo stanoveno OD<sub>600</sub> pomocí přístroje Synergy™ H4 (Biotek, Winooski, VT, US) a 50  $\mu$ l alikvoty byly přepipetovány do nové destičky spolu s 2  $\mu$ l 25 mM 4-methylumbeliferyl galaktosidu (Sigma-Aldrich). Vzorke byly inkubovány 15 min při 37 °C a reakce byla zastavena roztokem 130 mM glycinu a 80 mM uhličitanu sodného pH 10,7 (NaOH). Fluorescence vzniklého 4-methylumbeliferonu byla stanovena přístrojem Synergy™ H4. Pro porovnání aktivity vzorků bez a s přidaným *tZ* byly vypočteny poměry fluorescenčního signálu, hodnoty OD<sub>600</sub> a délky inkubace bez/s ligandem.



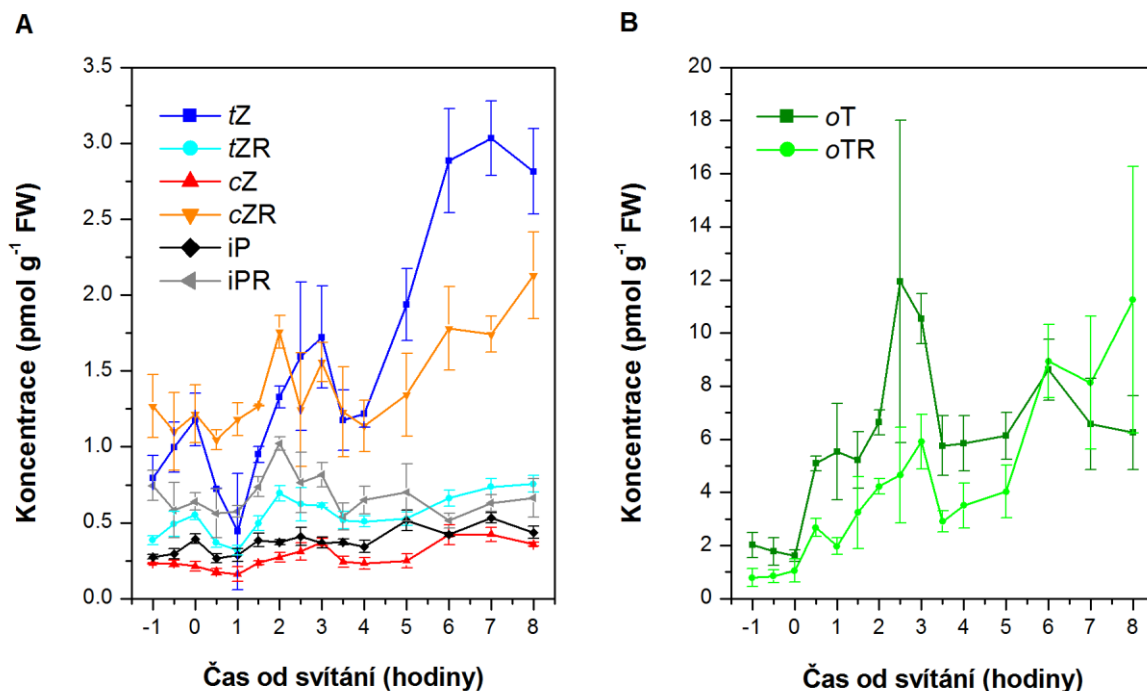
## 6 VÝSLEDKY

Původním cílem disertační práce bylo objasnit původ postranního řetězce aromatických cytokininů pomocí radioaktivně značených meziproductů metabolismu aromatických látek. První kapitola experimentální části práce stručně shrnuje výsledky téměř dvou let snažení, které bylo zaměřeno na výběr vhodného modelového organismu a následně na odvození a charakterizaci *in vitro* kultury topolu druhu *Populus × canadensis* (cv. *Robusta*). Nemožnost replikovat některé dříve publikované výsledky jakož i četné další komplikace nakonec vedly k přehodnocení cílů práce. Následující dvě kapitoly jsou proto věnovány charakterizaci IPT a HK cytokininových receptorů z *P. × canadensis*. V důsledku změny zaměření práce bylo potřeba zvládnout řadu nových metod zejména z oblasti molekulárního klonování, heterologní exprese rekombinantních proteinů, jejich purifikace a charakterizace.

### 6.1 Výběr modelového organismu pro studium aromatických cytokininů

Primární selekce vhodného modelového organismu proběhla na základě literární rešerše, a dostupnosti biologického materiálu. Byly vybrány následující organismy: *Agrobacterium tumefaciens* (kmen GV3103), *Chenopodium rubrum*, *P. × canadensis*, *Protococcus viridis* a *Rhodococcus fascians* (kmeny D5, D188 a MTR2). Následovala jejich kultivace, izolace a purifikace cytokininů a konečně analýzy obsahu cytokininů pomocí UHPLC-MS/MS. V případě kultur obou bakterií, *A. tumefaciens* a *R. fascians*, stejně jako v buněčné suspenzní kultuře a listech *Ch. rubrum* nebyly za daných experimentálních podmínek aromatické cytokininy detekovány. Domnělá kultura *P. viridis*, získaná od prof. Dr. Vince Ördöga, CSc. (University of West Hungary, Sopron, Maďarsko), byla později doc. RNDr. Petrem Hašlerem, PhD. (Algologická laboratoř katedry botaniky, UP v Olomouci) určena jako *Chlorella sorokiniana*. Pravděpodobně došlo k omylu při odeslání vzorků skupinou prof. Ördöga. Studiu cytokininů v této řase se dále ve své bakalářské práci věnovala Mgr. Simona Juříková (2016), které se sice podařilo identifikovat volný *oT* a v hydrolyzátu tRNA také *oTR*, avšak jejich koncentrace byly pro další práci shledány jako nedostatečné. Jediným zkoumaným organismem, který aromatické cytokininy (*oT* a *oTR*) produkoval v dostatečném množství, byl *P. × canadensis*.

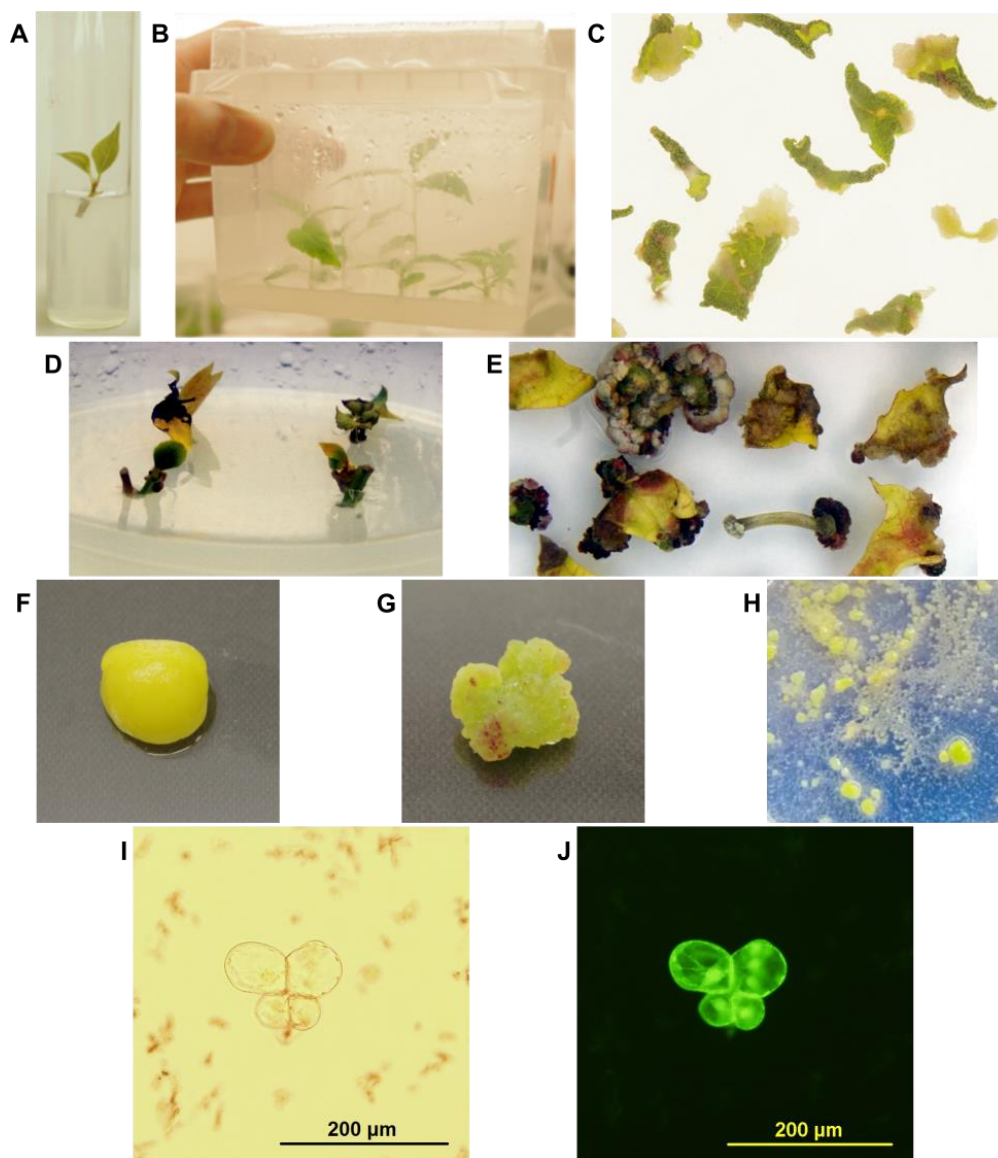
Na jaře roku 2014 bylo v areálu přírodovědecké fakulty UP (Olomouc-Holice) vysazeno asi 50 mladých stromků *P. × canadensis* pro zajištění dostatku čerstvého biologického materiálu. Začátkem léta byl proveden sběr plně rozvinutých listů v půlhodinových až hodinových časových intervalech, počínaje hodinu před rozbřeskem. UHPLC-MS/MS analýza cytokininů izolovaných a přečištěných ze vzorků listů prokázala značnou dynamiku koncentrací některých isoprenoidních (*tZ* a *cZR*) a obou detekovaných aromatických (*oT* a *oTR*) cytokininů v průběhu dne (Obr. 8). Koncentrace *oT* v listech kulminovala 2,5 hodiny po východu Slunce na úrovni  $11,9 \pm 6,1$  pmol g<sup>-1</sup> čerstvé váhy (FW; z anglického fresh weight), zatímco nejvýraznější nárůst koncentrace *oTR* se dostavil později, 6-8 hodin po osvit. Tento experimentální sad posloužil také jako zdroj listových pupenů pro odvození *in vitro* kultury. I přes ochranná opatření, jakými bylo pletivo kolem kořenového balu a kmene, však dvě následující zimy nepřežil jediný strom zejména kvůli okusu zvěří (hraboši, zajáci a srny).



**Obrázek 8** Časový profil změn koncentrací vybraných isoprenoidních (**A**) a aromatických (**B**) cytokininů v plně rozvinutých listech mladých stromů *P. × canadensis*. Sběr listů byl proveden 3. července 2014, poprvé hodinu před východem slunce. Body v grafu reprezentují zprůměrované výsledky analýz tří replikátů, včetně standardních odchylek, které byly odebrány ze společně homogenizovaných, náhodně vybraných listů.

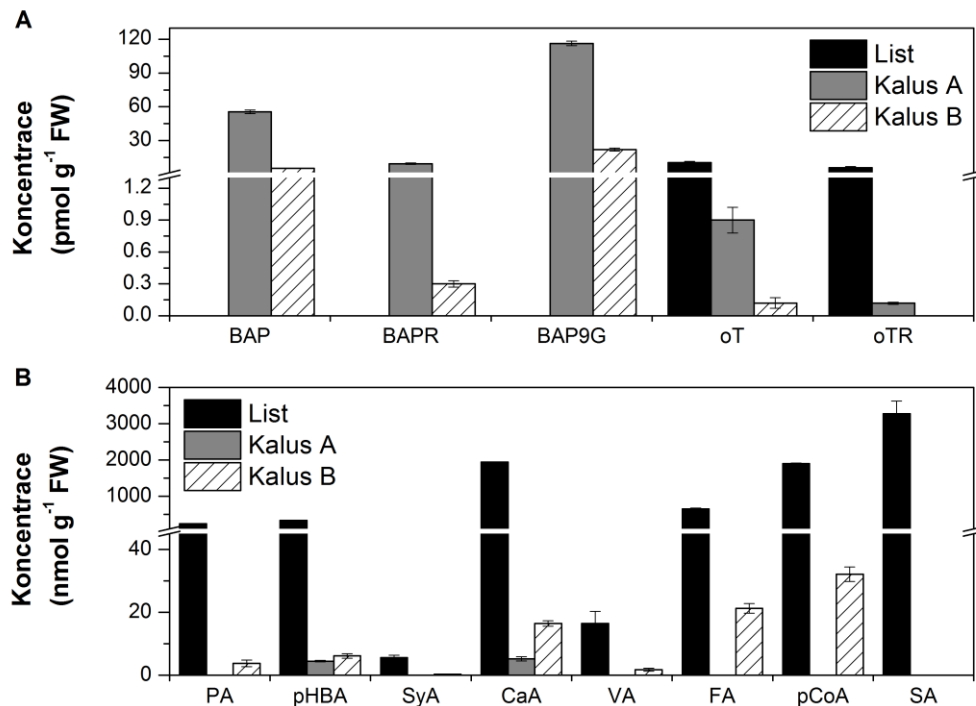
Jelikož experimenty s radioaktivně značenými meziprodukty aromatického metabolismu není praktické provádět na topolech pěstovaných v hlíně, bylo rozhodnuto pokusit se odvodit *in vitro* kulturu *P. × canadensis*, ideálně až do stádia buněčné suspenze. Během měsíční stáže v Belgii na Ghent University (Department of plant production) jsem si proto pod vedením Dr. Danny Vereecke osvojil základy práce s rostlinnými explantátovými kulturami. Čerstvě vyrašené pupeny hybridního topolu *Populus tremula × Populus alba*, který byl použit pro výuku, se podařilo přenést do *in vitro* podmínek, zregenerovat jim kořenový systém a také z nich odvodit kalusovou kulturu (Obr. 9A-C). Analogický postup však v případě *P. × canadensis* nefungoval, explantáty ztrácely chlorofyl a brzy umíraly (Obr. 9D-E). Tento problém se nepodařilo vyřešit ani s asistencí Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AVČR a PřF UP v Olomouci). Situaci dále komplikoval fakt, že pro kultivaci topolu *in vitro* nebylo žádoucí přidávat do pěstebních médií aromatické cytokininy (*mT* nebo BAP), které jsou pro práci s rostlinnými explantáty s úspěchem široce využívány (Aremu et al. 2012). Exogenní aplikace aromatických cytokininů by totiž kolidovala s plánovaným studiem jejich biosyntézy.

Kalusovou kulturu pěstovanou v kapalném MS20 médiu obsahujícím *tZ* se nakonec podařilo získat ve spolupráci se skupinou RNDr. Jany Malé, CSc. (toho času působící ve Výzkumném ústavu lesního hospodářství a myslivosti, Jíloviště). Původní kalusy, označované v dalším textu jako „kalus A“, měly žlutou barvu a poměrně tuhou strukturu (Obr. 9F). Po jejich přenosu na tuhé MS20 médium a několikerém pasážování začaly produkovat chlorofyl, nediferenciované pletivo kalusů změklo a poměrně snadno se rozpadalo na menší části (Obr. 9G). Tento typ kalusů je dále označován jako „kalus B“. Opětný přenos nejméně soudržných částí kalusů B do kapalného MS20 média, jeho kultivace na třepačce a selekce co nejmenších shluků pletiva při pasážování vedla k odvození kultury blízké buněčné suspenzi (Obr. 9H, drobné shluky buněk). Při pozorování zakaleného média po dvoutýdenní kultivaci těchto mikrokalusů pod mikroskopem v něm byly jasně viditelné shluky několik málo rostlinných buněk (Obr. 9I). Jejich životaschopnost byla ověřena přidavkem fluorescein diacetátu a pozorováním fluorescence při 490/530 nm (Obr. 9J). Tato kultura byla z morfologického hlediska shledána dostatečnou pro další studium biosyntézy aromatických cytokininů.



**Obrázek 9** Fotografie *in vitro* kultur hybridních topolů *P. tremula* × *P. alba* (A-C) a *P. × canadensis* (D-J). Explantát čerstvě přenesený do *in vitro* podmínek (A), rostliny se zregenerovaným kořenovým systémem (B) a tvorba kalusů na okrajích listových řezů umístěných na indukčním médiu (C). Snaha o přenos explantátů *P. × canadensis* do *in vitro* podmínek (D) a jejich regeneraci (E). Kalus odvozený RNDr. Janou Malou, CSc. udržovaný v kapalném MS20 médiu (F) a kalus po přenosu a několikerém pasážování na pevném MS20 médiu (G). Mikrokalusy vzniklé během snahy o odvození buněčné suspenzní kultury (H). Buňky v suspenzní kultuře pozorované pod mikroskopem ve viditelném spektru (I) a po obarvení fluorescein diacetátem (ověření životaschopnosti buněk) při excitační/emisní vlnové délce 490/530 nm (J). Na snímky A, D a E byla v programu GIMP 2.8 aplikována funkce pro automatické vyvážení bílé barvy. Měřítka na snímcích I a J bylo manuálně posunuto do prostoru výřezu. Ostatní fotografie jsou prezentovány pouze škálované na vhodnou velikost a oříznuté bez další grafické úpravy.

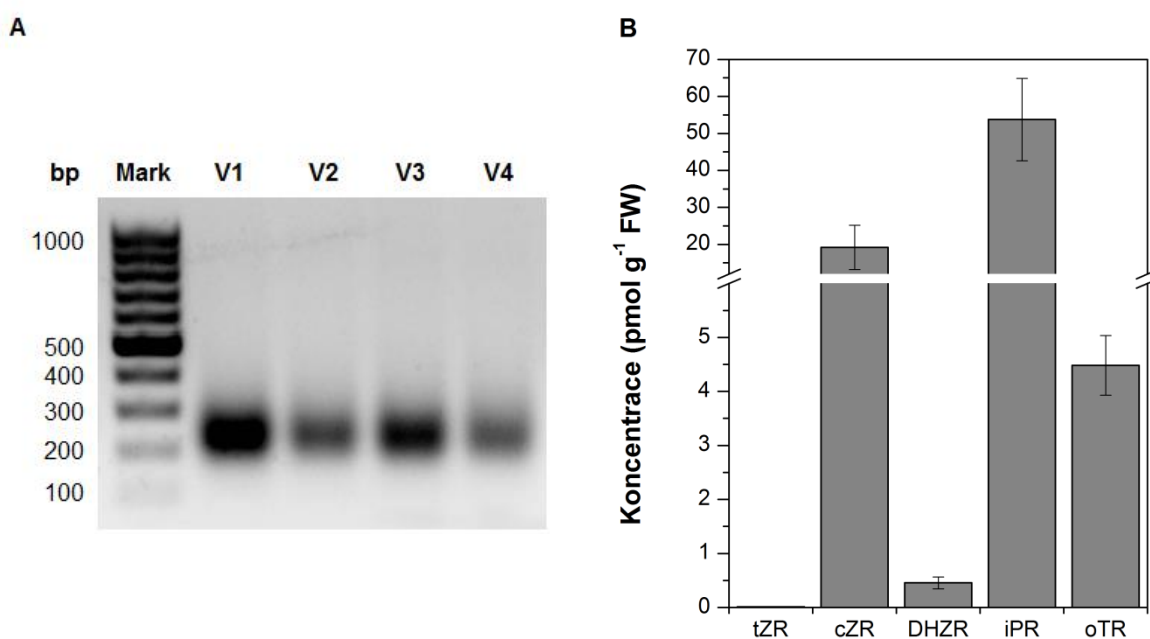
Paralelně s prací na odvození buněčné suspenzní kultury *P. × canadensis* byl v obou typech kalusů pomocí UHPLC-MS/MS analyzován obsah aromatických cytokininů a také fenolických kyselin. Překvapivým zjištěním byly velmi vysoké hladiny BAP a jeho sacharidových konjugátů stanovené v kalusech, neboť tyto cytokininy nebyly v listech mladých stromů vůbec detekovány (Obr. 10A). Zejména v původním kalusu A dosahovala koncentrace všech forem BAP v souhrnu přibližně 180 pmol g<sup>-1</sup> FW. Pro srovnání jsou v Obr. 10A znázorněny také koncentrace aromatických cytokininů v listech topolu sklizených 3 hodiny po východu slunce. Z grafu je patrné, že hladiny oT a oTR byly v kalusech naopak podstatně nižší.



**Obrázek 10** Koncentrace aromatických cytokininů (**A**) a vybraných fenolických kyselin (**B**) stanovených ve vzorcích kalusů a v listech mladých stromů *P. × canadensis* sklizených 3 hodiny po východu slunce. Hodnoty zobrazené v grafu představují zprůměrované výsledky analýz tří replikátů včetně standardních odchylek. Panel **B** zobrazuje součet koncentrací volných fenolických kyselin, jejich glykosidů a esterů. Kalusy A a B odpovídají těm prezentovaným na Obr. 9F respektive Obr. 9G. BAPR = benzyladeninribosid; BAP9G = benzyladenin-9-glukosid. PA = kyselina protokatechová; pHBA = kys. *para*-hydroxybenzoová; SyA = kys. syringová; CaA = kys. kávová; VA = kys. vanilová; FA = kys. ferulová; pCoA = kys. *para*-kumarová; SA = kys. salicylová.

Stanovení obsahu fenolických kyselin pak bylo realizováno pro ověření, do jaké míry *in vitro* podmínky u kalusů ovlivňují metabolismus aromatických látek, konkrétně šikimátovou a navazující fenylypropanoidovou dráhu. Produkce fenolických kyselin byla v obou případech oproti listům dramaticky snížena (Obr. 10B). Ve vzorcích kalusu A byly nad limitem kvantifikace detekovány pouze kyseliny *para*-hydroxybenzoová a kávová. Situace byla poněkud lepší u kalusu B, pěstovaného na pevném MS20 médiu. Hladiny fenolických kyselin však i zde dosahovaly přibližně jen 1 % koncentrací stanovených v listech. Kyselina salicylová, jejíž obsah byl v listech nejvyšší ( $3280 \pm 340 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$ ), nebyla detekována ani v jednom z kalusů.

Posledním typem experimentu provedeným v rámci této části disertační práce byla analýza obsahu cytokininů vázaných v tRNA, respektive ve směsi malých RNA, izolované z kalusů *P. × canadensis*. Případná kontaminace izolované tRNA jinými druhy nukleových kyselin byla ověřena pomocí elektroforézy na agarosovém gelu (Obr. 11A). Ze vzorků



**Obrázek 11** Elektroferogram tRNA izolované z kalusů *P. × canadensis* (**A**) a výsledek semikvantitativního stanovení cytokininů z hydrolyzátu tRNA (**B**). Byl použit elektroforetický marker GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Hodnoty znázorněné v panelu **B** reprezentují průměr a směrodatné odchytky ze čtyř replikátů (V1 až V4 v panelu **A**). bp = páry bází (z anglického „base pair“); DHZR = dihydrozeatin ribosid.

tRNA po alkalické hydrolyze byly následně přečištěny a analyzovány cytokininy pomocí UHPLC-MS/MS. Nejvýrazněji zastoupeným cytokininem byl iPR ( $54 \pm 11$  pmol g<sup>-1</sup> FW) následovaný cZR. V topolové tRNA byl vázán také oTR v množství přibližně  $4,5 \pm 0,5$  pmol g<sup>-1</sup> FW. Stanovení cytokininů v hydrolyzátu tRNA bylo však pouze semikvantitativní, neboť nebyl dostupný interní standard (tRNA s vázaným deuterovaným cytokininem). Tématu cytokininů v topolové tRNA se ve své bakalářské respektive magisterské práci dále věnovali Mgr. Věra Dosedělová a Mgr. Štěpán Kouřil.

Zásadní problém, který znemožnil samotné studium původu postranního řetězce aromatických cytokininů, se ukázal během kontrolní analýzy obsahu cytokininů v kalusových kulturách provedené přibližně po čtyřech měsících od jejich získání. BAP stejně jako oT a oTR nebyly po několikerém pasážování (každé 2-3 týdny) detekovány v žádné z kalusových kultur. Koncentrace sacharidových derivátů BAP se pak pohybovaly blízko limitu kvantifikace, tedy v rozmezí 0,01 až 0,2 pmol g<sup>-1</sup> FW. Čerstvou a životaschopnou *in vitro* kulturu *P. × canadensis* se již nepodařilo znovu získat a pro nemožnost pokračovat s experimenty bylo nezbytné přistoupit ke změně cílů práce.

## 6.2 Charakterizace topolových isopentenyltransferas

Rozhodnutí pokusit se charakterizovat topolové IPT bylo učiněno s ohledem na možnost jejich účasti na biosyntéze aromatických cytokininů. Tato kapitola shrnuje můj podíl na řešení předestřené problematiky a do značné míry se překrývá s obsahem prvního z mých prvoautorských článků (Jaworek et al. 2019a). Primárně bylo nezbytné klonovat a nechat osekvenovat všech 9 *IPT* genů z *P. × canadensis* (*PcIPT*), jejichž exprese ve vybraných orgánech topolu pak mohla být analyzována pomocí kvantitativní PCR. Na úrovni aminokyselinových sekvencí adenylátových IPT byla dále provedena fylogenetická analýza a porovnání jejich aktivních míst zejména s chmelovou IPT (HIIPT; podle latinského *Humulus lupulus*), jejíž struktura je známa. Zároveň probíhala snaha o heterologní expresi všech *IPT* v *E. coli* a navazující purifikaci rekombinantních proteinů, které měly být podrobeny studiu enzymové aktivity *in vitro*. Jelikož se tímto přístupem nepodařilo získat proteiny v rozpustné a aktivní formě, kolega Mgr. David Zalabák, Ph.D. většinu z topolových *IPT* genů zatransformoval do genomu *Arabidopsis* pod kontrolou inducibilního promoteru. Po vyselektování homozygotních linií bylo alespoň možné ověřit funkčnost příslušných *IPT in vivo*.

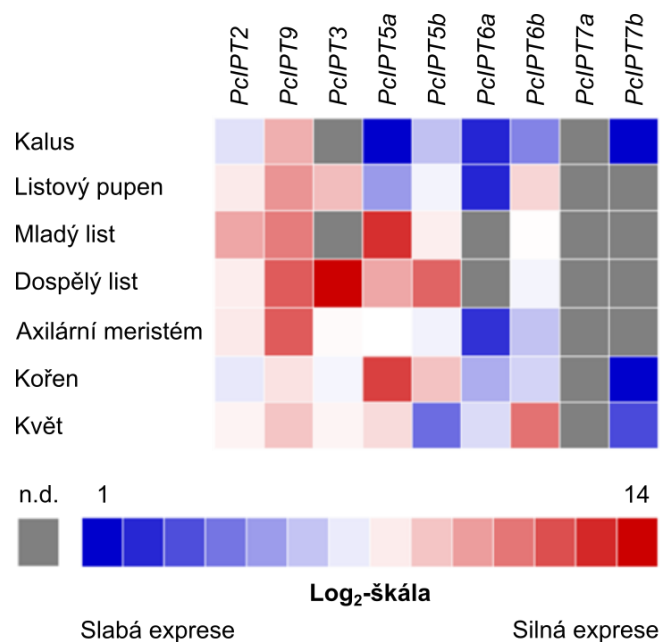
Návrh primerů pro klonování *IPT* z *P. × canadensis* (*PcIPT*) byl proveden na základě sekvencí ortologních genů *P. trichocarpa*, toho času jediného topolu se známým genomem. Hledání sekvencí *IPT* v databázi Phytozome 3.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) usnadnila dřívější publikace, ve které byla uvedena příslušná identifikační čísla (Immanen et al., 2013; Tab. 1). Některé sekvence však byly chybně anotovány, vyhledání chyb a jejich oprava byla konzultována s Mgr. Davidem Kopečným, Ph.D. Všechny geny s výjimkou *PcIPT7a* a *PcIPT7b* se podařilo PCR amplifikovat z cDNA, zbylé dva byly po četných nezdarech nakonec amplifikovány přímo z genomické DNA. Následně byly všechny *IPT* klonovány do vektoru Zero Blunt, sekvenovány a s výjimkou paralogů *PcIPT7* byly jejich sekvence vloženy do databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Příslušná identifikační čísla jsou společně s dalšími údaji uvedena v Tab. 1. V případě obou paralogů *PcIPT7* byl přítomný intron odstraněn PCR amplifikací celé zbývající části genů a vektorů, načež byl produkt reakce opětovně ligován.

**Tabulka 1** Přehled topologických *IPT* genů obsahující identifikační čísla (ID) jejich sekvencí v databázích GenBank a Phytozome, číslo chromozomu, kde se nacházejí, počet exonů a počet aminokyselin v proteinech, které kódují.

Označení genu	GenBank ID	Phytozome ID ( <i>P. trichocarpa</i> )	Číslo chromozomu	Počet exonů	Počet aminokyselin
<i>PcIPT2</i>	KU319560	Potri.009G147600	9	10	495
<i>PcIPT9</i>	KU319561	Potri.001G376600	1	11	445
<i>PcIPT3</i>	KU319566	Potri.014G139300	14	1	326
<i>PcIPT5a</i>	KU319564	Potri.008G202200	8	1	328
<i>PcIPT5b</i>	KU319565	Potri.010G030500	10	1	327
<i>PcIPT6a</i>	KU319562	Potri.008G121500	8	1	360
<i>PcIPT6b</i>	KU319563	Potri.010G123900	10	1	368
<i>PcIPT7a</i>	/	Potri.004G150900	4	2	333
<i>PcIPT7b</i>	/	Potri.008G033300	8	2	335



Přesná znalost sekvencí *PcIPT*, které se od ortologů z *P. trichocarpa* liší o 11 (*PcIPT5b*) až 64 (*PcIPT2*) párů bází, umožnila navrhnout primery a TagMan próby pro analýzu genové exprese pomocí kvantitativní PCR po reverzní transkripci (RT-qPCR). Výsledky této analýzy objasňují, proč nebylo možné z dostupných vzorků cDNA amplifikovat paralogy *PcIPT7*. Zatímco *PcIPT7a* nebyla exprimována v žádném z analyzovaných orgánů topolu, *PcIPT7b* byla detekována pouze v rozmezí 2 až 8 transkriptů na 1 ng RNA izolované z kalusů, kořenů a květů (Obr. 12; Jaworek et al., 2019a). Ze zbývajících adenylátových IPT byla dále velmi slabě nebo vůbec exprimována *PcIPT6a*, naopak *PcIPT6b* byla převažujícím homologem ve květech. Jistou míru orgánové specifity naznačuje také silná exprese *PcIPT3* a *PcIPT5b* v plně rozvinutých listech a *PcIPT5a* v mladých listech a kořeni. *PcIPT2* s *PcIPT9*, tedy obě tRNA *IPT*, byly poměrně rovnoměrně exprimovány napříč studovanými orgány, avšak výrazně více abundantní z této dvojice byla *PcIPT9*. Zároveň se jedná o jedinou *IPT*, jejíž exprese nebyla podstatně snížena v kalusech pěstovaných na médiu obsahujícím *tZ*.

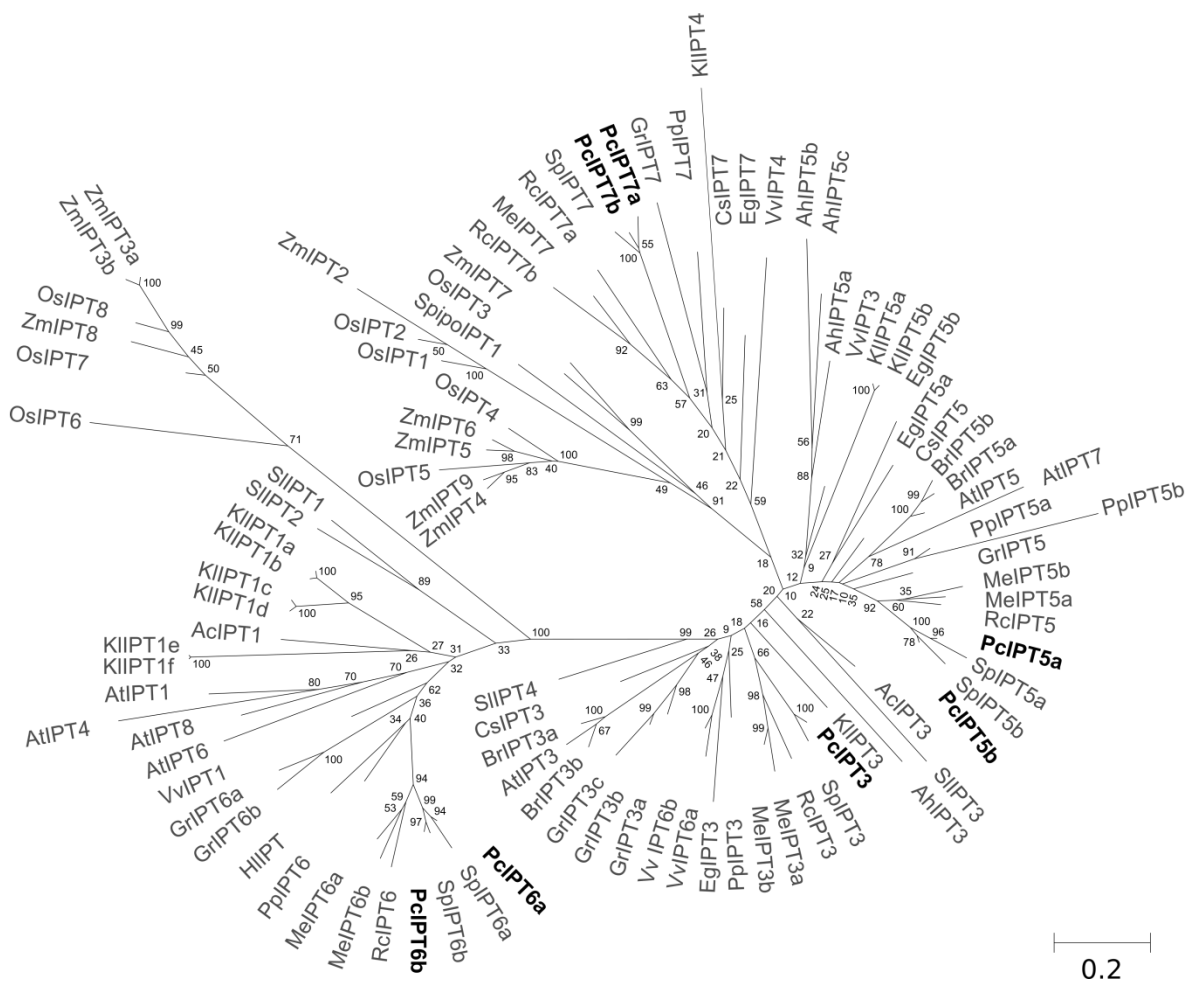


**Obrázek 12** Expresní profil *IPT* genů z *P. × canadensis* ve vybraných orgánech znázorněný pomocí mapy intenzity. Absolutní počty transkriptů na 1 ng celkové RNA jsou vyjádřeny jako log<sub>2</sub> s přiřazenými barvami od nejnižších (modrá) po nejvyšší (červená) hodnoty. Šedá barva je použita v případech, kdy exprese příslušného genu nebyla detekována (n.d.).

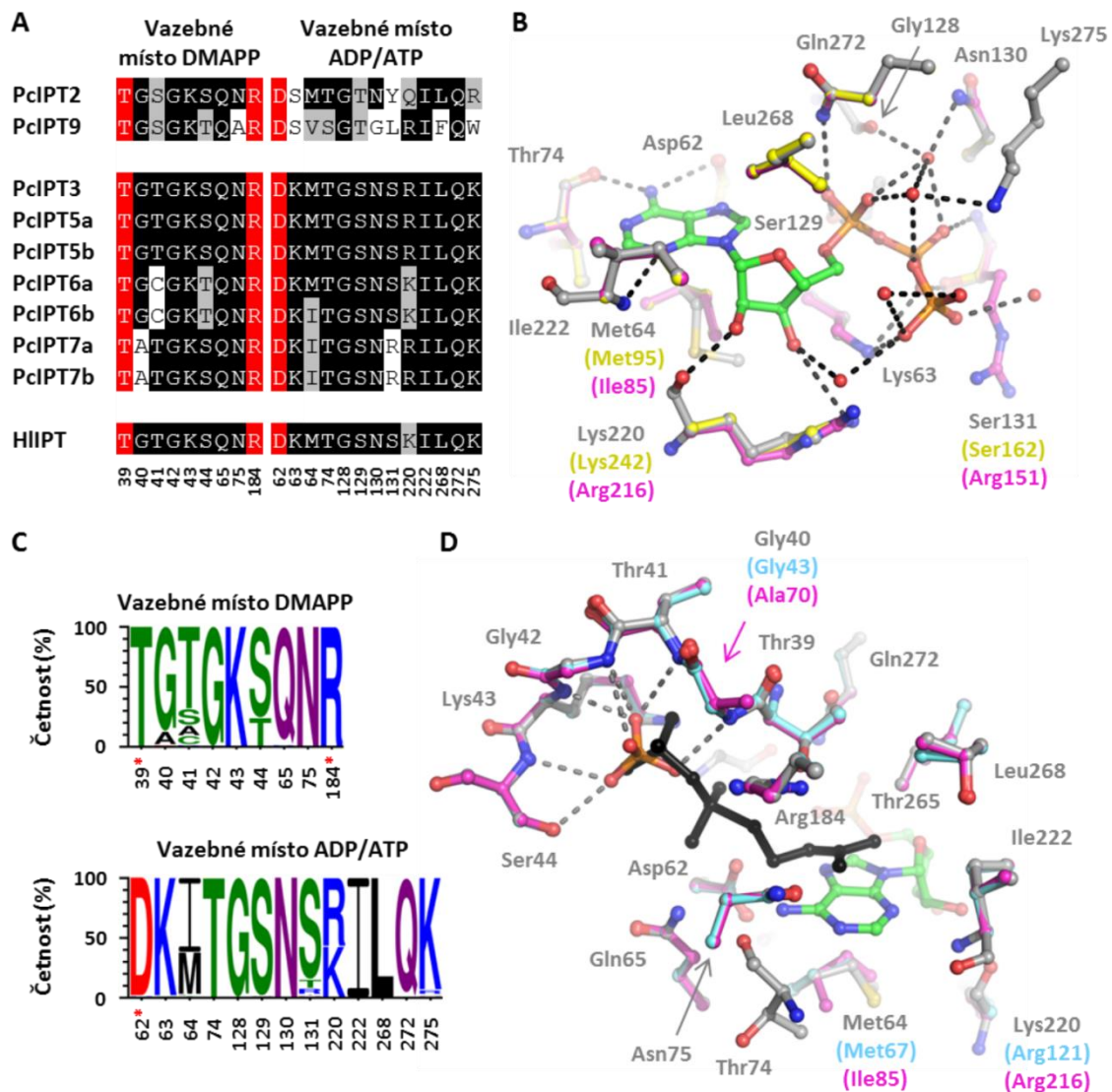
Rozsáhlý fylogenetický strom zkonstruovaný z konzervovaných částí aminokyselinových sekvencí adenylátových IPT topolu a dalších 17 rostlinných druhů (Obr. 13) demonstruje jejich evoluční příbuznost. Pozice topolových IPT je platná také pro druhy *P. trichocarpa* a *P. deltoides*, jelikož jejich ortologní sekvence se vzájemně liší minimálně bez záměn v aktivním místě (Jaworek et al. 2019a). PcIPT3 stejně jako její ortolog z vrby (*Salix purpurea*) a *Arabidopsis* obsahuje C-koncový motiv CLVA, který může být farnesylován, což ovlivňuje subcelulární lokalizaci proteinu (Galichet et al. 2008). Tento motiv není přítomen v žádné ze zbývajících IPT zahrnutých ve fylogenetické analýze. Oba paralogy PcIPT5 klastrují s AtIPT5 a AtIPT6, zatímco paralogy PcIPT6a jsou evolučně blízké čtyřem IPT *Arabidopsis* (AtIPT1, AtIPT4, AtIPT6 a AtIPT8) a také chmelové IPT. Fylogenetická větev obsahující PcIPT7a a PcIPT7b je pak vývojově bližší jedné ze skupin adenylátových IPT jednoděložných rostlin než ostatním IPT rostlin dvouděložných (Obr. 13). Zajímavostí je, že oba paralogní geny *PcIPT7* stejně jako jejich ortology z broskvoně (*Prunus persica*), manioku (*Manihot esculenta*) a skočce (*Ricinus communis*) obsahují intron, což je mezi adenylátovými IPT netypické.

Aminokyselinové složení aktivního místa topolových IPT bylo blíže prostudováno se záměrem posoudit možnost využití potenciálního aromatického analogu DMAPP nebo HMBPP jako substrátu. Rezidua v aktivním místě adenylátových IPT topolu jsou značně konzervovaná, největší rozdíly byly nalezeny u paralogů PcIPT6 a PcIPT7 (Obr. 14A). Žádná z přítomných záměn však není v rámci souboru sekvencí použitých pro fylogenetickou analýzu unikátní (Obr. 14C). S využitím struktury HIIPT (Chu et al., 2010; PDB ID: 3A8T) jako templátu se dále podařilo zkonstruovat modely několika vybraných IPT pomocí programu SWISS-MODEL (Waterhouse et al. 2018). Porovnání modelů s HIIPT bylo diskutováno s Mgr. Davidem Kopečným, Ph.D. Záměny Lys220 (číslování podle HIIPT), přítomného v celé fylogenetické větvi obsahující PcIPT6a, za Arg u ostatních topolových IPT stejně jako Met64 za Ile u PcIPT6b a obou paralogů PcIPT7 jsou pravděpodobně bez výraznějších důsledků pro vazbu substrátu. Arg přítomný u obou PcIPT7 namísto Ser131 potom může vést ke zvýšení afinity k ADP/ATP díky intenzivnější polární interakci s fosfátovými skupinami (Obr. 14B).

Variace reziduí na pozicích 40, 41 a 44 v rámci DMAPP vazebného místa (Obr. 14A a C) ovlivňují vazbu substrátu také jen minimálně. Tyto aminokyseliny totiž s fosfátovými skupinami DMAPP interagují zejména prostřednictvím vodíkových vazeb vycházejících z dusíkových atomů hlavního polypeptidového řetězce (Obr. 14D).



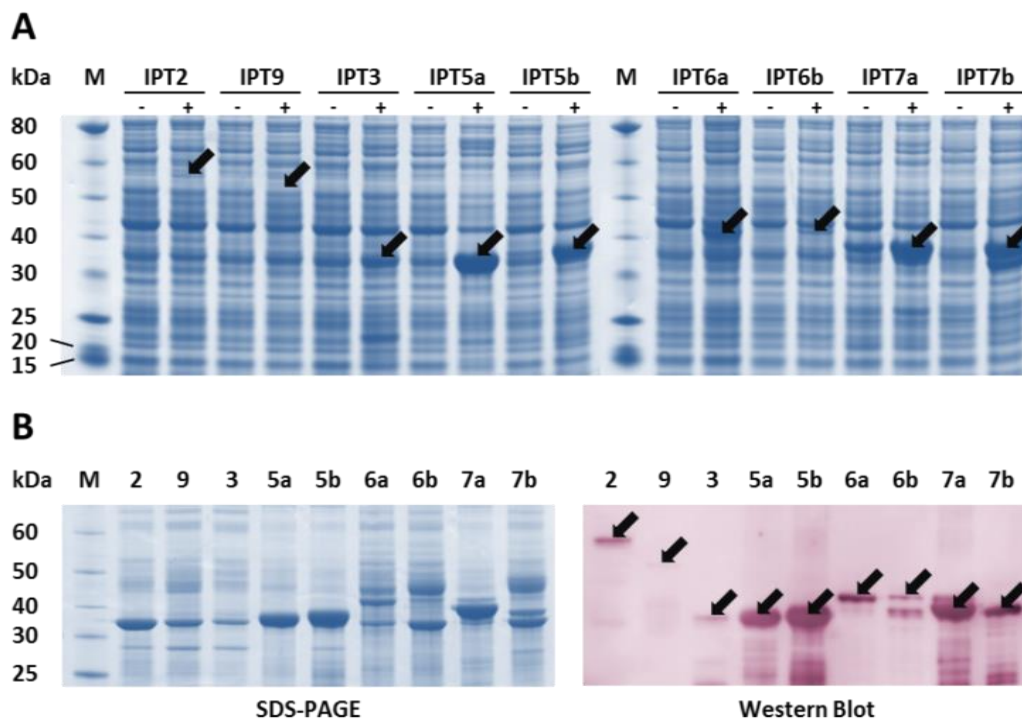
**Obrázek 13** Fylogenetický strom vypočítaný metodou maximální věrohodnosti („maximum likelihood“) zahrnuje celkem 99 aminokyselinových sekvencí adenylátových IPT z 18 rostlinných druhů. Hodnoty uvedené v blízkosti jednotlivých uzlů reprezentují statistickou pravděpodobnost konkrétního větvení v procentech (metoda „bootstrapping“ s parametrem 1000 opakování). Měřitko udává průměrný počet záměn aminokyselin. Zkratky zobrazených rostlinných druhů: Ac = *Aquilegia coerulea*, Ah = *Amaranthus hypochondriacus*, At = *Arabidopsis thaliana*, Br = *Brassica rapa*, Cs = *Citrus sinensis*, Eg = *Eucalyptus grandis*, Gr = *Gossypium raimondii*, Hl = *Humulus lupulus*, Kl = *Kalanchoe laxiflora*, Me = *Manihot esculenta*, Os = *Oryza sativa*, Pp = *Prunus persica*, Rc = *Ricinus communis*, Sp = *Salix purpurea*, Sl = *Solanum lycopersicum*, Sp = *Spirodela polyrhiza*, Vv = *Vitis vinifera*, Zm = *Zea mays*.



**Obrázek 14** Porovnání aktivních míst IPT z *P. × canadensis*. Zarovnání aminokyselinových reziduí všech PcIPT a chmelové HIPT (A); katalytická rezidua jsou vyznačena červeným podbarvením. Porovnání struktury ADP/ATP vazebného místa HIPT (šedá) s modely PcIPT6a (žlutá) a PcIPT7b (magenta; B). Četnost výskytu aminokyselinových reziduí v aktivních místech 99 adenylátových IPT (stejný soubor jako pro fylogenetickou analýzu; C); obrázek byl vytvořen ve webové aplikaci WebLogo; katalytická rezidua jsou označena červenou hvězdičkou. Porovnání struktury DMAPP vazebného místa HIPT (šedá) s modely PcIPT5a (azurová) a PcIPT7b (magenta; D). Všechny modely byly vytvořeny pomocí serveru Swiss-model podle struktury HIPT (PDB ID: 3A8T) jako templátu. DMAPP (černá) v panelu D pochází ze superpozice (program WinCoot) struktury tRNA IPT *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 3EPL). Obrázky struktur byly vygenerovány a editovány v programech PyMol a Inkscape. Číslování reziduí se ve všech panelech řídí sekvencí HIPT.

Pro produkci rekombinantních proteinů v *E. coli* bylo všech devět topologických *IPT* genů překlonoáno z vektoru Zero Blunt do expresních vektorů pCDFDuet-1, pETDuet-1 nebo pET-28a(+). Primery použité během prvotní amplifikace genů z cDNA nebo genomické DNA obsahovaly kromě sekvence specifické pro daný gen také restriční místa, která byla během toho sekundárního klonování využita. Geny *PcIPT5a*, *PcIPT6a* a *PcIPT7a* byly navíc objednány jako syntetické s kodony optimalizovanými pro expresi v *E. coli*, tyto konstrukty bylo nadále používány přednostně. S výjimkou *PcIPT9* byla exprese ve všech případech úspěšná. Proteiny ve vzorcích buněčných lyzátů jednotlivých kmenů *E. coli* byly separovány pomocí SDS-PAGE, po obarvení gelů byly viditelné elektroforetické pásy v oblasti molekulových hmotností, které přibližně odpovídaly vypočteným molekulovým hmotnostem příslušných PcIPT (Obr. 15A). Identita PcIPT byla potvrzena MALDI-TOF analýzou tryptických štěpů proteinů vyizolovaných z gelu, kterou provedl prof. Mgr. Marek Šebela, Dr. (Jaworek et al. 2019a).

Rekombinantní PcIPT se však nepodařilo detekovat ve frakci rozpustných proteinů získaných po lýzi *E. coli*. Nepomáhala ani snaha o optimalizaci expresních podmínek, zejména teploty (16 – 30 °C), času (4 – 20 hodin), složení média (přídavek sorbitolu a trimethylglycinu) a koncentrace isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosidu (50 – 500 mM) jakožto indukčního agens. Převážná část rekombinantních proteinů přesto končila v inkluzních těliscích, které byly pro další analýzu solubilizovány močovinou. PcIPT odpovídající elektroforetické pásy je možné vidět na elektroferogramu se vzorky inkluzních tělísek a také na fotografii membrány po následném blotování (Obr. 15B). Imunohistochemická vizualizace PcIPT na membráně byla možná díky přítomnosti polyhistidinové kotvy, (His-tag) která byla do sekvence proteinů vnesena z expresních vektorů. Tato kotva měla sloužit pro snadnou purifikaci rekombinantních proteinů.

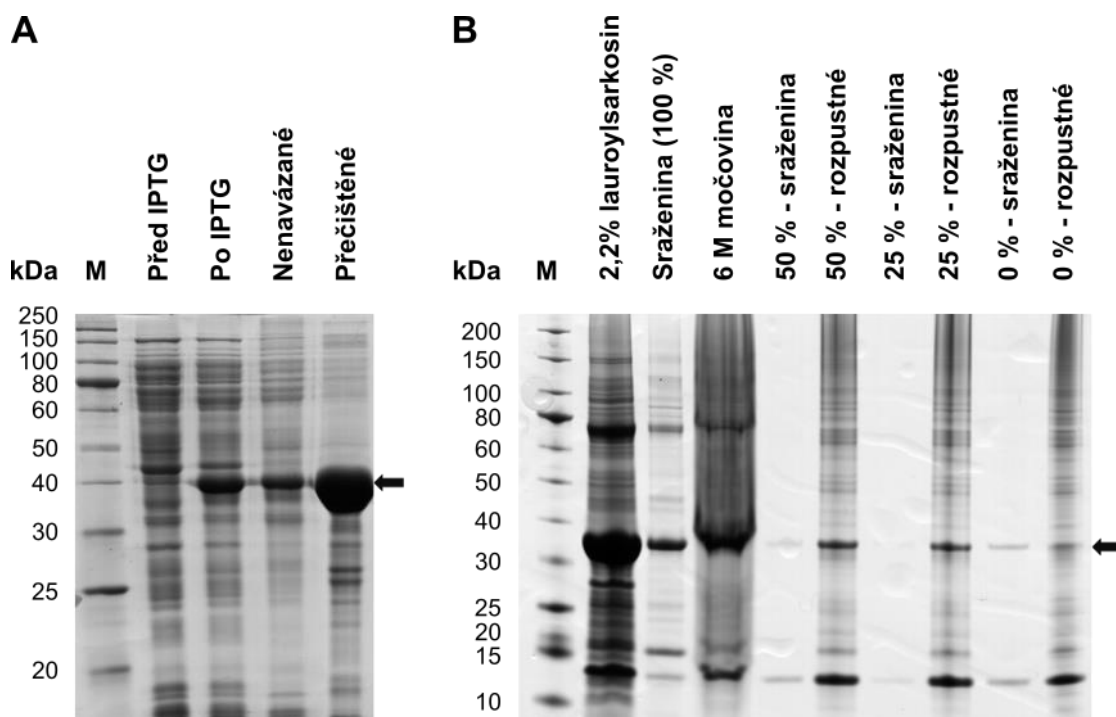


**Obrázek 15** Výsledky analýzy proteinů přítomných ve kmenech *E. coli* exprimujících jednotlivé *PcIPT* geny. Elektroferogram po SDS-PAGE separaci vzorků buněčných lyzátů – vzorky před (-) a po (+) 16hodinové indukci při 20 °C (A). Elektroferogram po SDS-PAGE separaci vzorků solubilizovaných inkluzních tělísek izolovaných z *E. coli* po indukci a fotografie membrány po následném přenosu proteinů z gelu metodou western blot (B). Gely po SDS-PAGE byly barveny Coomassie Brilliant Blue. Imunodetekce proteinů na polyvinilidenfluoridové membráně byla provedena pomocí protilátky proti polyhistidinové kotvě (6xHis-Tag) a sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatase. Barvení membrány bylo provedeno roztokem NBT/BCIP. Byly použity NuPAGE prefabrikované gely (Thermo Fisher Scientific) a proteinový marker Protein ladder 10-200 kDa (NEB). Šipky označují očekávanou polohu jednotlivých PcIPT.

Kvůli omezení počtu zpracovávaných vzorků byla další snaha o získání aktivního rekombinantního enzymu soustředěna zejména na PcIPT5a a případně PcIPT7a, které byly v bakteriální kultuře produkovány nejlépe (Obr. 15A). Pro práci se všemi PcIPT byl standardně používán Tris/HCl pufr o pH odpovídajícím jejich vypočtenému isoelektrickému bodu. Lýze PcIPT5a a PcIPT7a byla navíc testována v prostředí HEPES a K-fosfátového pufru o pH blízkém isoelektrickému bodu, v rozmezí hodnot o dvě jednotky nižší a vyšší. Ani použití rozdílných pufrů nevedlo ke zvýšení podílu PcIPT v rozpustné fázi. Dále byla provedena vsádková purifikace ( $\text{Co}^{2+}$  ionty chelátované

na kyselinu iminodioctovou vázanou na sepharosu) případného rozpustného zbytku PcIPT5a ze 2 l bakteriální kultury s využitím His-tagu. Přestože na gelu po následné SDS-PAGE nebyl viditelný pás odpovídající PcIPT5a, zahuštěný vzorek byl přes noc inkubován s DMAPP a ATP. Ve výsledné směsi nebyl detekován žádný z nukleotidů iP nebo jeho metabolity.

Neúspěchy s rozpustnou fází vyústily ve snahu získat aktivní PcIPT z inkluzních tělísek jejich solubilizací a následným postupným skládáním proteinů zpět do nativního stavu. Pro solubilizaci inkluzních tělísek byly vyzkoušeny roztoky Tris-HCl pufrů o vhodném pH

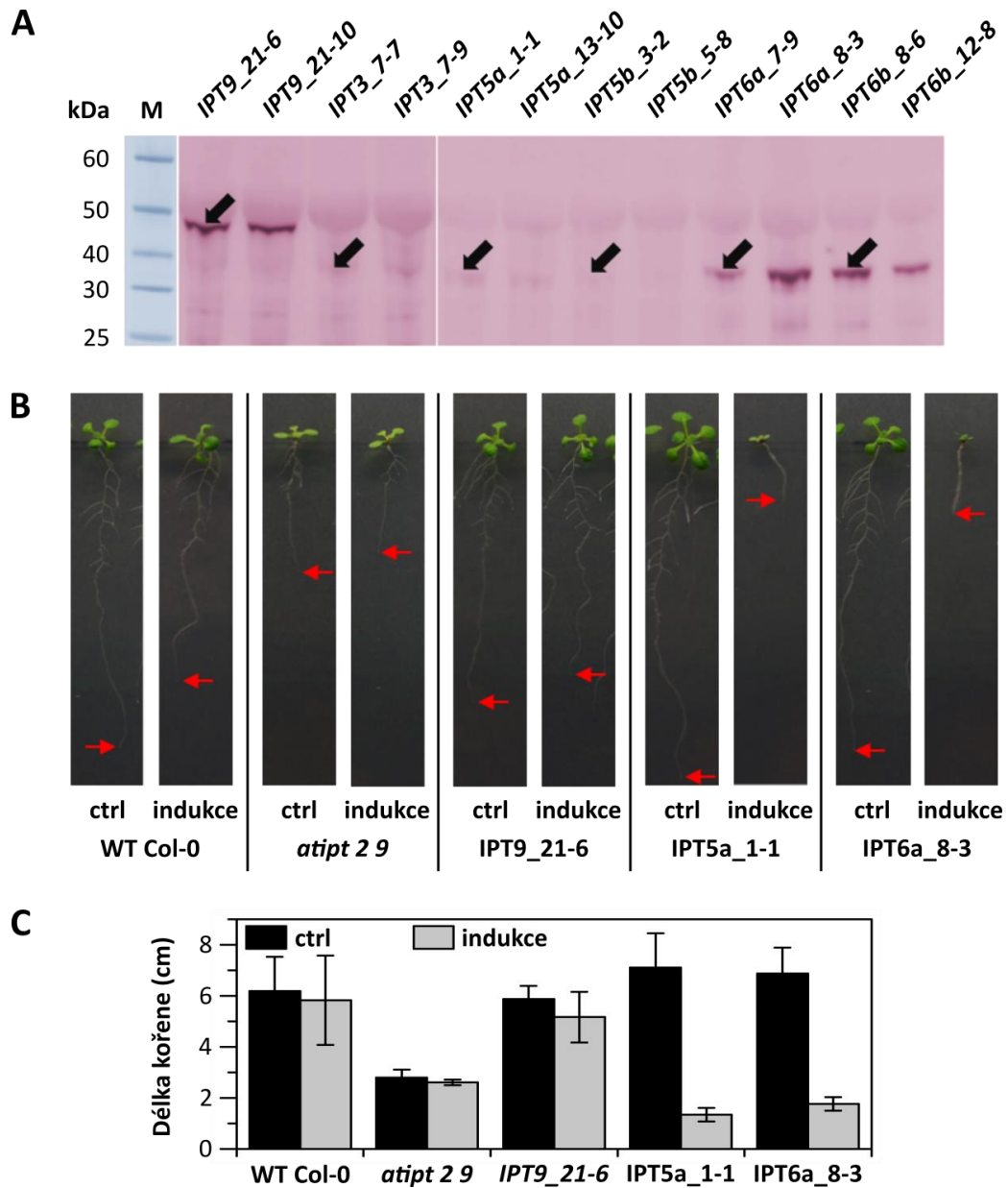


**Obrázek 16** Elektroferogram po SDS-PAGE pořízený během purifikace aktivních PcIPT z inkluzních tělísek. Kontrolní analýza vzorku PcIPT7a purifikovaného na kolonce HisPur (Thermo Fisher Scientific) z inkluzních tělísek za denaturačních podmínek v přítomnosti 6 M guanidinu (A) – vzorky před a po indukci IPTG, frakce nenavázaných proteinů a zakoncentrovaná frakce přečištěných proteinů; klasický polyakrylamidový gel a marker Protein ladder 10-250 kDa (NEB). Kontrolní analýza vzorku PcIPT5a během snahy o postupné složení proteinů ze solubilizovaných inkluzních tělísek pomocí dialýzy (B) – vzorek proteinů solubilizovaných ve 2,2 % N-lauroylsarkosinu, sraženina nerozpustná v močovíně, vzorek převedený do 6 M močoviny a dvojice vzorků sraženiny a rozpustných proteinů odebraných při snižující se koncentraci močoviny (uvedeno v procentech původního množství) během dialýzy; NuPAGE prefabrikovaný gel (Thermo Fisher Scientific) a marker Protein ladder 10-200 kDa (NEB). Oba gely byly barveny Coomassie Brilliant Blue. Šipky označují očekávanou polohu jednotlivých PcIPT.

doplněné o 6 M močovinu, 6 M guanidin, nebo 2,2 % N-lauroylsarkosin. Následně byly vzorky buď rovnou v několika krocích dialyzovány proti klesající koncentraci močoviny, nebo byly PcIPT nejprve purifikovány za denaturačních podmínek v přítomnosti zvoleného chaotropního činidla pomocí chelatační chromatografie (ionty  $\text{Co}^{2+}$ ). Vzorky rekombinantních proteinů bylo možné značně přečistit a zakonzentrovat i v denaturovaném stavu, jak je možné vidět na příkladu PcIPT7a (Obr. 16A). Během opětovného skládání proteinů postupným snižováním koncentrace chaotropního činidla však docházelo k tvorbě sraženiny obsahující majoritu požadovaných PcIPT. Přestože například finální dialyzát nepřečištěného vzorku PcIPT5a nejspíš obsahoval zbytek rekombinantního proteinu (Obr. 16B), při jeho inkubaci s DMAPP a ATP v reakční směsi nevznikal očekávaný produkt. Alternativně byla pro opětovné skládání proteinu vyzkoušena také gelová permeační chromatografie, přičemž použitá mobilní fáze na rozdíl od nanášeného vzorku neobsahovala chaotropní činidlo. Ani tento postup však nevedl k zisku aktivních PcIPT.

Z důvodu neaktivity rekombinantních PcIPT produkovaných v *E. coli* nebylo možné stanovit jejich kinetické parametry. Bylo tedy rozhodnuto alespoň ověřit, zda jsou funkční *in vivo*. Kolegovi Mgr. Davidu Zalabákovi, Ph.D. se podařilo transformovat rostliny *Arabidopsis* geny pro PcIPT3, PcIPT5a/b, PcIPT6a/b a PcIPT9 fúzované s Myc tagem pod kontrolou estradiolem indukovatelného promoteru. Adenylátové *PcIPT* byly vneseny do rostlin divokého typu, zatímco pro *PcIPT9* byl zvolen dvojitý mutant *atipt 2 9* s umlčenými oběma geny pro původní tRNA IPT. Pro každý konstrukt se mi podařilo vyselektovat minimálně dvě nezávislé homozygotní linie *Arabidopsis* nesoucí v genomu vždy právě jednu kopii příslušného genu. Třítýdenní rostliny pak byly po dobu 24 h indukovány estradiolem a použity pro další analýzy. Kolegové pomocí RT-qPCR stanovili nárůst exprese *PcIPT* genů a pomocí LC-MS/MS kvantifikovali změny hladin cytokininů po indukci, tyto výsledky budou diskutovány později. Přítomnost PcIPT na úrovni proteinů byla ověřena s využitím SDS-PAGE, western blottingu a imunohistochemické detekce. Největší množství rekombinantních proteinů bylo po indukci detekováno u linií nesoucích *PcIPT9* a oba paralogy *PcIPT6*, zbývající PcIPT byly produkovány jen slabě (Obr. 17A).





**Obrázek 17** Detekce PcIPT ve směsi proteinů izolovaných z transgenních rostlin *Arabidopsis* a jejich fenotyp. Fotografie PVDF membrány po western blottingu (**A**); PcIPT byly detekovány pomocí protilátky proti Myc tagu a sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatase. Barvení membrány bylo provedeno roztokem NBT/BCIP. Sloupec s proteinovým markerem (Protein ladder 10-200 kDa; NEB) pochází z předcházejícího gelu po SDS-PAGE barvení Coomassie Brilliant Blue. Šipky označují očekávanou pozici jednotlivých PcIPT. Fotografie reprezentativních kontrolních (WT Col-0 a *atipt 2 9*) a transgenních rostlin *Arabidopsis* pěstovaných bez (ctrl) nebo s (indukce) estradiolem přidaným do média (**B**); červené šipky označují pozici kořenové špičky. Graf znázorňující průměrnou délku kořene kontrolních a transgenních rostlin (n = 6) - bez estradiolu v médiu (ctrl), nebo indukovaných (**C**).

Na závěr byl u vybraných linií (na základě exprese *PcIPT* a hladin cytokininů; Jaworek et al. 2019a) sledován fenotyp. Přítomnost estradiolu v médiu téměř neovlivnila růst WT rostlin ani kontrolních mutantů *atipt 2 9*, které se vyznačovaly výrazně kratším kořenem a také pomalejším vývojem nadzemní části (Obr. 17B,C). Fenotyp těchto mutantů byl zvrácen přítomností *PcIPT9* genu, a to i bez indukce estradiolem. Zřetelné rozdíly mezi kontrolními a indukovanými rostlinami pak byly pozorovány u linií *PcIPT5a* a *PcIPT6a*. Rostliny měly extrémně krátký primární kořen bez viditelného větvení, zakrnělou nadzemní část a při delší kultivaci v přítomnosti estradiolu hynuly.

### 6.3 Charakterizace cytokininových receptorů z topolu

Přítomnost *oT* a *oTR* v listech *P. × canadensis* vedla k myšlence ověřit, jaká je jejich afinita k topolovým cytokininovým receptorům a při tom je podrobněji charakterizovat. Veškeré zde prezentované výsledky pak tvoří jádro mého druhého prvoautorského článku (Jaworek et al. 2019b). Nejprve bylo všech pět genů pro topolové cytokininových HK receptory (*PcHK*) klonováno a osekvenováno. Pomocí qPCR byla stanovena míra jejich exprese ve vybraných rostlinných orgánech. Na proteinové úrovni byla provedena jejich fylogenetická analýza a pomocí modelů struktur senzoričkových CHASE domén prostudováno vazebné místo. Dále byly *PcHK* překlonovány do expresního vektoru pINIII a transformovány do *E. coli* kmene KMI001 (Suzuki et al. 2001). Tento expresní systém byl použit pro kompetiční receptorové testy prováděné s živými buňkami *E. coli* (Romanov et al. 2005, 2006), díky kterým bylo možné stanovit afinity všech studovaných *PcHK* k vybraným isoprenoidním a aromatickým cytokininům. Bylo také stanoveno pH optimum receptorů, potvrzena jejich kinasová aktivita a ověřena jejich schopnost vázat cytokininové ribosidy.

Prvotní klonování *PcHK* bylo analogické jako v případě *PcIPT*. Pro jejich amplifikaci z cDNA byly použity primery navržené podle sekvencí cytokininových receptorů *P. trichocarpa* získaných z databáze Phytozome 3.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) na základě dřívější publikace (Immanen et al., 2013; Tab. 2). *PcHK* byly klonovány do vektoru Zero Blunt a jejich následné sekvenování bylo provedeno po částech metodou „primer walking“, jelikož velikost jednotlivých genů se pohybuje v rozmezí 3018 až 3783 bp. *PcHK2* přitom byla z cDNA amplifikována v celkem čtyřech variantách sestříhu, z nichž jediná kódovala funkční protein (Obr. 18). Sekvence této varianty byla

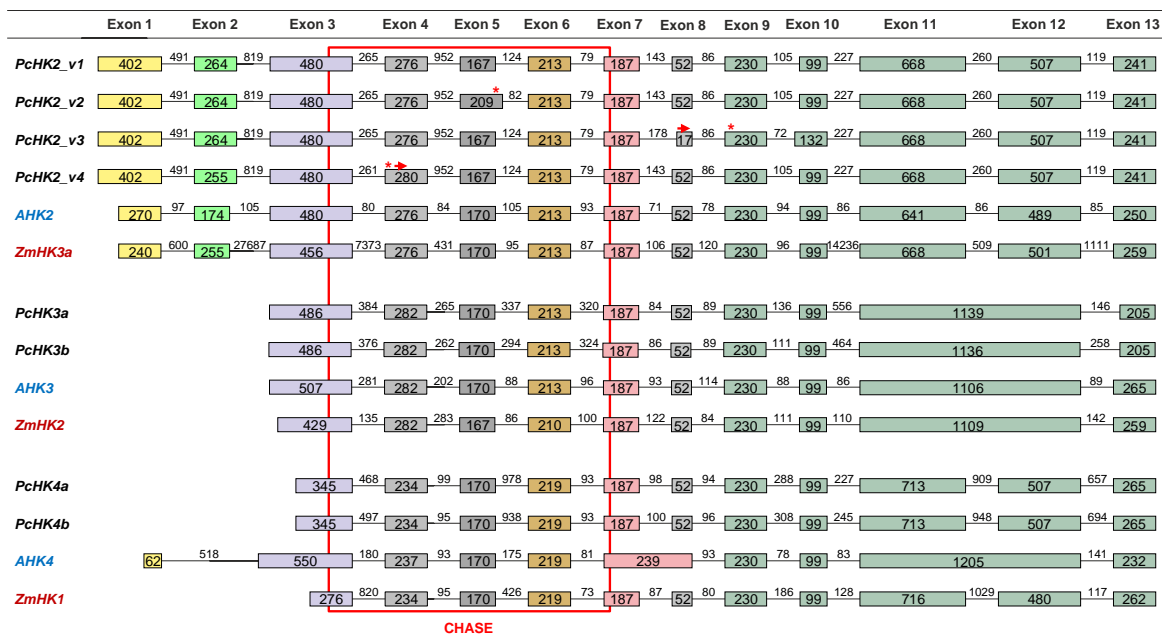
**Tabulka 2** Přehled topolových *HK* genů obsahující identifikační čísla (ID) jejich sekvencí v databázích GenBank a Phytozome, číslo chromozomu, kde se nacházejí, počet aminokyselin v příslušných proteinech a počet transmembránových (TM) segmentů. Pro predikci polohy TM segmentů na základě aminokyselinových sekvencí byl použit server TMPred ([https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)).

Označení genu	GenBank ID	Phytozome ID ( <i>P. trichocarpa</i> )	Číslo chromozomu	Počet aminokyselin	Počet TM segmentů
<i>PcHK2</i>	MH248795	Potri.014G164700	14	1261	4
<i>PcHK3a</i>	MH248793	Potri.001G057400	1	1020	3
<i>PcHK3b</i>	MH248794	Potri.003G171000	3	1019	3
<i>PcHK4a</i>	MH248791	Potri.008G137900	8	1006	2
<i>PcHK4b</i>	MH248792	Potri.010G102900	10	1006	2

spolu s ostatními *PcHK* vložena do databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pod identifikačními čísly uvedenými v Tab. 2.

Na základě zarovnání sekvencí *PcHK* s homologními geny z *Arabidopsis* (*AHK*) a kukuřice (*ZmHK*) byly vytvořeny modely genů znázorňující velikosti jejich exonů a intronů (Obr. 18). Sekvence kódující CHASE doménu je u všech *PcHK* zachována. Délka a počet exonů je u orthologů *HK2* mezi těmito druhy konzervovaná s výjimkou prvního exonu *PcHK2*, který je přibližně o 150 bp delší. Ještě výrazněji jsou konzervovány homology *HK3*, největší rozdíly byly naopak zaznamenány u homologů *HK4*. Zatímco sekvence obou paralogních genů *PcHK* jsou velice podobné genu z kukuřice, začátek sekvence *AHK4* je přibližně o 240 bp delší a rozdělen do dvou exonů. Dvě dvojice exonů, přítomné u *PcHK4* a *ZmHK*, jsou pak v případě *AHK4* sloučeny (Obr. 18).

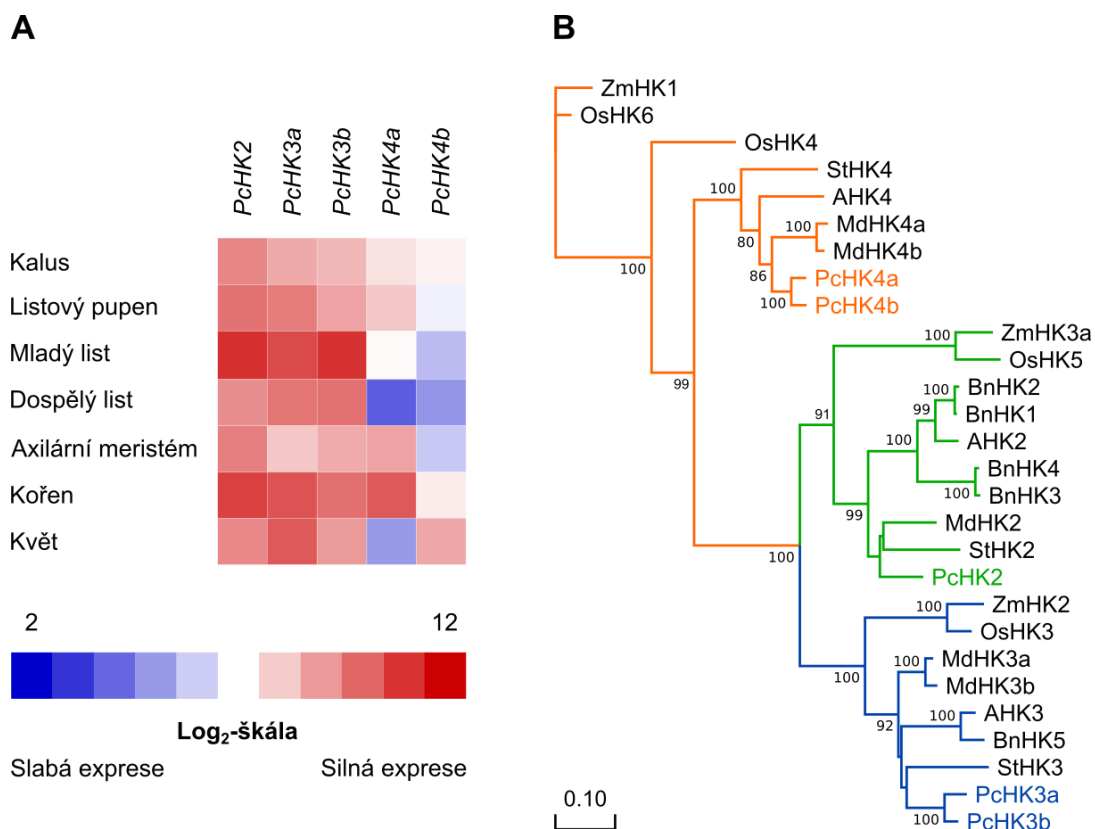
Byla navržena sada primerů a Tagman prób pro RT-qPCR analýzu exprese *PcHK* ve stejné sadě vzorků, která byla dříve použita pro analogickou analýzu *PcIPT*. Napříč studovanými orgány byla nejsilněji exprimována *PcHK2* (Obr. 19A), množství detekovaných transkriptů na 1 ng se pohybovalo v rozmezí 600-2200. Expres obou paralogů *PcHK3* je podobná, stejně jako v případě *PcHK2* bylo největší množství transkriptů přítomno v RNA izolované z mladých listů topolu. Naopak mezi paralogy *PcHK4* byly zaznamenány dva hlavní rozdíly. Celkově je *PcHK4a* exprimována více než *PcHK4b*, jejíž exprese je zároveň v rámci studovaných orgánů topolu nejslabší



**Obrázek 18** Modely *HK* genů z *Arabidopsis*, kukuřice (*ZmHK*) a topolu seřazené podle jejich homologie, které znázorňují velikost (bp) jednotlivých exonů (obdélníky) a intronů (spojnice). Modely *PcHK* byly odvozeny na základě zarovnání sekvencí s jejich orthology z *P. trichocarpa*, jehož genom je znám. V případě *PcHK2* jsou zobrazeny čtyři klonované varianty sestříhu, přičemž pouze *PcHK2\_v1* kóduje funkční protein. Červené hvězdičky a šipky indikují polohu stop kodonu, respektive počátek posunu čtecího rámce. Červený obdélník ohraničuje části sekvencí kódující senzorecké CHASE domény.

(30-170 transkriptů na 1 ng RNA). Dále je mezi nimi patrná výraznější orgánová specifita, transkripty *PcHK4a* jsou nejabundantnější v kořenech zatímco *PcHK4b* ve květech.

Každá ze tří hlavních větví fylogenetického stromu, zkonstruovaného na základě zarovnání aminokyselinových sekvencí HK topolu a dalších pěti rostlinných druhů, obsahuje vždy po jednom zástupci receptoru z *Arabidopsis* (Obr. 19B). Přítomnost tří různých skupin HK je také zachována u všech analyzovaných druhů s výjimkou brukve řepky (*Brassica napus*) postrádající ortholog k *AHK4* (Kuderová et al. 2015). Z analýzy je dále patrná větší evoluční příbuznost větví zahrnujících *PcHK2* a *PcHK3*, než každé z nich k větví *PcHK4* (Obr. 19B). Také expresní profily *PcHK2* a paralogů *PcHK3* vykazují podobný rys - jsou poměrně intenzivně exprimovány napříč topolovými orgány, zatímco exprese obou genů *PcHK4* je více orgánově specifická (Obr 19A). Co do velikosti genů a jejich členění na exony a introny jsou si naopak podobnější *PcHK3* a *PcHK4* (Obr. 18).



**Obrázek 19** Expresní profil *HK* genů z *P. × canadensis* ve vybraných orgánech znázorněný pomocí mapy intenzity (**A**). Absolutní počty transkriptů na 1 ng celkové RNA jsou vyjádřeny jako  $\log_2$  s přiřazenými barvami od nejnižších (modrá) po nejvyšší (červená) hodnoty. Fylogenetický strom vypočítaný metodou maximální věrohodnosti („maximum likelihood“) zahrnující celkem 28 aminokyselinových sekvencí HK ze šesti rostlinných druhů (**B**). Hodnoty uvedené v blízkosti jednotlivých uzlů reprezentují statistickou pravděpodobnost konkrétního větvení v procentech (metoda „bootstrapping“ s parametrem 1000 opakování). Měřítka udává průměrný počet záměn aminokyselin. Zkratky zobrazených rostlinných druhů: A = *Arabidopsis thaliana*, Bn = *Brassica napus*, Md = *Malus domestica*, Os = *Oryza sativa*, St = *Solanum tuberosum*, Zm = *Zea mays*.

Živé bakteriální kultury *E. coli* exprimující jednotlivé PcHK byly použity pro stanovení afinity různých cytokininů k receptorům. Všechna měření byla realizována s využitím tritiem značeného *tZ* o známé specifické aktivitě a scintilačního počítače. Nejprve bylo nutné stanovit disociační konstanty [ $^3\text{H}$ ]-*tZ* pro všechny receptory, jelikož jeho koncentrace přibližně odpovídající  $K_D$  byly dále používány v kompetičních testech. [ $^3\text{H}$ ]-*tZ* byl inkubován s příslušnými bakteriálními kulturami v rozmezí koncentrací 0,5-30 nM. Na základě naměřených hodnot počtu radioaktivních rozpadů za minutu bylo možné určit množství [ $^3\text{H}$ ]-*tZ* navázaného na receptor v každém bodě koncentrační řady a zkonstruovat

saturační křivky (Obr. 20A). Vypočtené hodnoty  $K_D$  se pak pohybovaly od 1,8 do 5,5 nM,  $tZ$  se na všechny topologové receptory váže velmi silně.

Afinita ostatních cytokininů byla stanovena kompeticí o vazbu na receptor mezi [ $^3H$ ]- $tZ$  a testovanými ligandy při různých koncentracích. Ze získaných křivek, znázorňujících kolik procent [ $^3H$ ]- $tZ$  zůstalo navázáno na receptor při dané koncentraci cytokininů (Obr. 20B), byly vypočítány hodnoty poloviční inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ). Následně bylo možné přepočítat hodnoty  $IC_{50}$  na  $K_i$  (Tab. 3) podle rovnice:

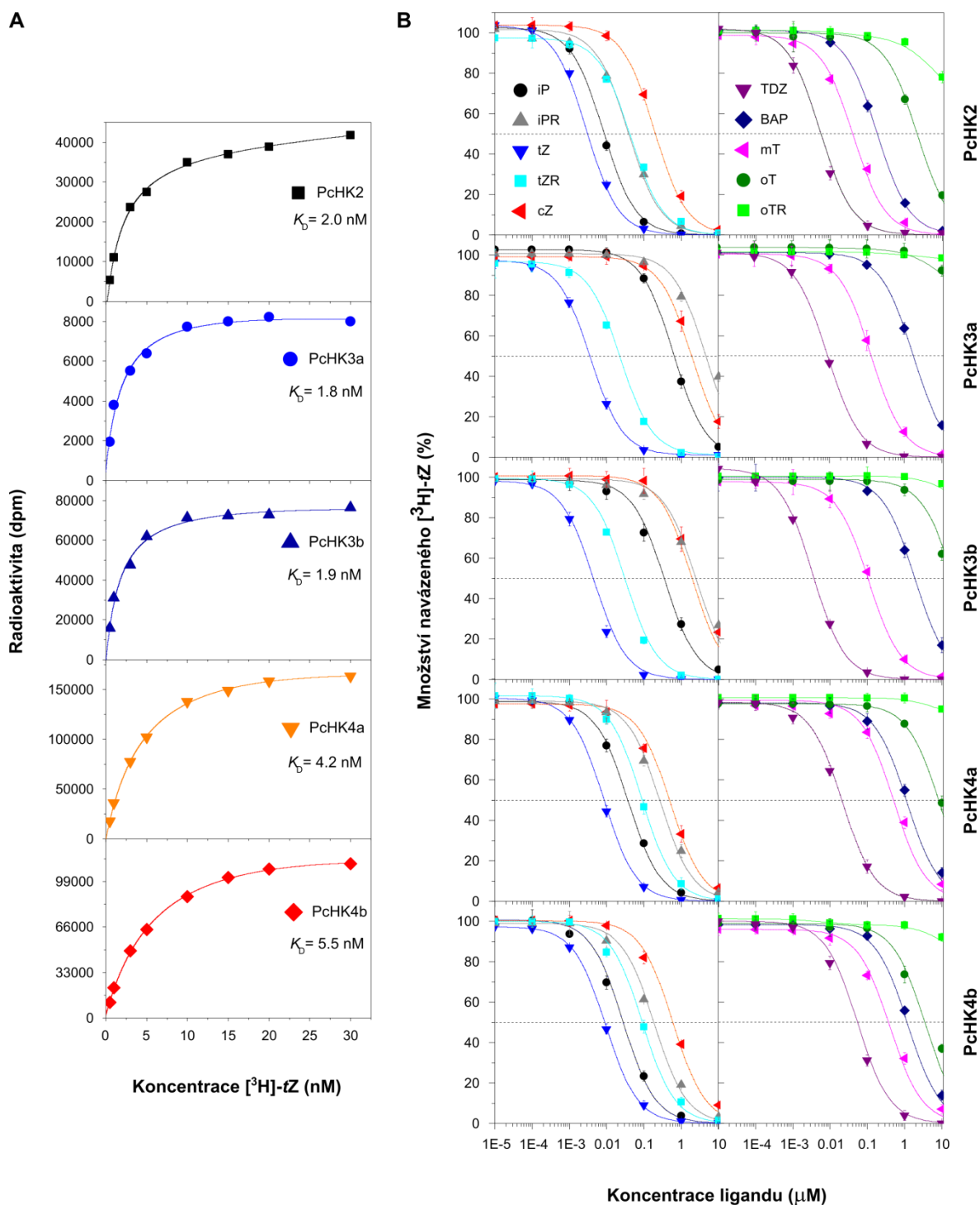
$$K_i = \frac{IC_{50}}{(1 + [S]/K_D)}$$

kde [S] reprezentuje koncentraci [ $^3H$ ]- $tZ$  a  $K_D$  jeho dříve stanovenou disociační konstantu. Tento přepočet je nezbytný, jelikož  $K_i$  reflektuje skutečné vlastnosti receptoru a ligandu, zatímco  $IC_{50}$  je zatížena konkrétním provedením experimentu (Cheng a Prusoff 1973).

Na všech pět receptorů se nejsilněji váže  $tZ$  a jen s malým odstupem syntetický TDZ, případně  $iP$  (Tab. 3, Obr. 20B). Zejména na paralogy PcHK3 se silně váže také  $tZR$  a na PcHK2 potom  $iPR$ , cytokininové ribosidy jsou však ve všech případech řádově horšími ligandy než příslušné volné báze. Afinita  $cZ$  je pak o 2-3 řády nižší než u jeho isomeru. Mezi aromatickými cytokininy má nejvyšší afinitu k PcHK  $mT$ , který je hojně využíván při práci s rostlinnými *in vitro* kulturami (Aremu et al. 2012). Naopak  $oT$  a zvláště  $oTR$  mají ke všem receptorům velmi malou afinitu, v rozsahu testovaných koncentrací cytokininů

**Tabulka 3** Vypočtené hodnoty  $K_i$  pro jednotlivé kombinace cytokininů a PcHK, průměry a směrodatné odchylky zahrnují soubor nejméně tří replikátů.

Cytokinin	$K_i$ (nM)				
	PcHK2	PcHK3a	PcHK3b	PcHK4a	PcHK4b
$iP$	3.9 ± 0.2	236 ± 13	147 ± 13	17 ± 0.9	14 ± 1
$tZ$	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.8 ± 0.2
$cZ$	106 ± 7	858 ± 113	1070 ± 194	205 ± 24	331 ± 22
$iPR$	22 ± 1	2270 ± 117	890 ± 81	125 ± 6	96 ± 11
$tZR$	24 ± 2	8.9 ± 0.8	11 ± 0.4	38 ± 3	53 ± 2.1
TDZ	2.2 ± 0.1	3.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	9.6 ± 0.5	23 ± 1
BAP	87 ± 5	704 ± 33	850 ± 82	601 ± 27	739 ± 39
$mT$	23 ± 2	55 ± 6	52 ± 5	302 ± 22	223 ± 16
$oT$	1100 ± 118	>5000	>5000	4500 ± 296	2820 ± 346



**Obrázek 20** Saturační křivky jednotlivých PcHK pro [<sup>3</sup>H]-tZ (**A**) a křivky znázorňující množství [<sup>3</sup>H]-tZ (koncentrace odpovídající  $K_D$ ) vázaného na PcHK během kompetice s různými cytokininy v koncentrační škále od 0,01 nM do 10  $\mu$ M (**B**). Všechna měření byla provedena s využitím živých buněk *E. coli* exprimujících jednotlivé PcHK. Radioaktivita [<sup>3</sup>H]-tZ vázaného na receptory byla měřena pomocí scintilačního počítáče v jednotkách dpm (počet rozpadů za minute; z anglického “decays per minute”). Všechny inkubace byly provedeny při pH 7,0.

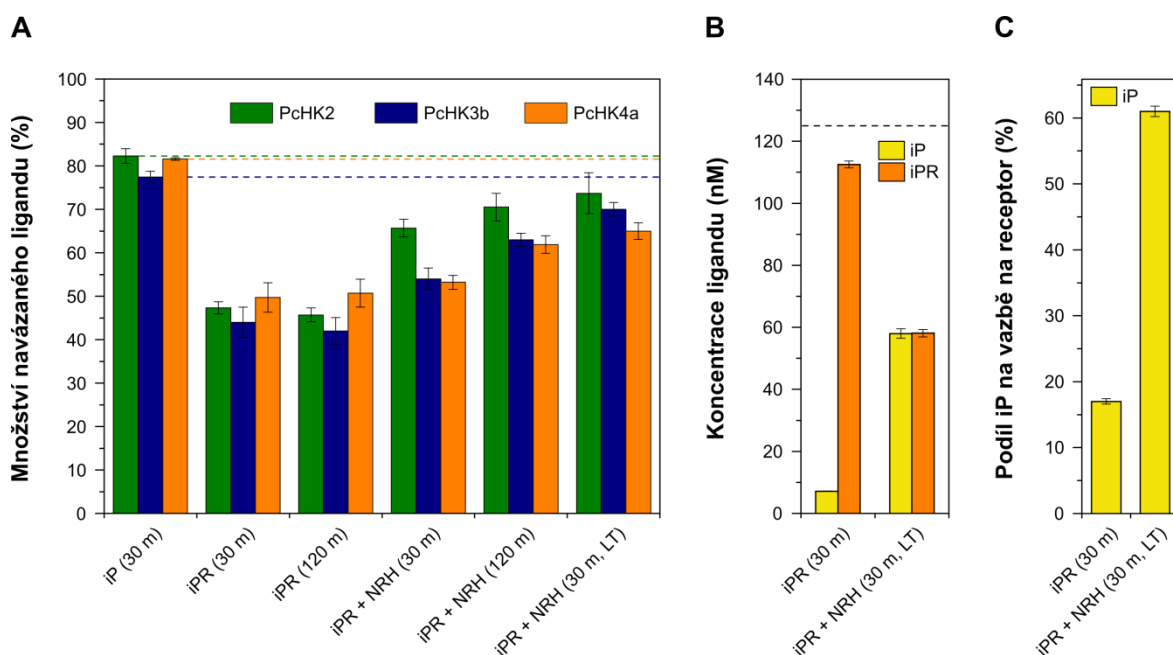
pro ně často ani nebylo možné stanovit  $K_i$ , respektive  $IC_{50}$ . Poněkud lépe než ostatní je *oT* schopna vázat PcHK2, která je obecně receptorem s nejvyšší senzitivitou k většině cytokininů (Tab. 3, Obr. 20B). Dvojice paralogních receptorů PcHK3 a PcHK4 pak mají k jednotlivým cytokininům velmi podobnou afinitu, nejvýraznějším rozdílem jsou hodnoty  $K_i$  pro iPR u PcHK3a a PcHK3b.

Schopnost receptorů vázat cytokininové ribosidy byla dříve zpochybněna argumentací, že na HK se ve skutečnosti váží volné báze vzniklé jejich hydrolyzou v průběhu experimentu (např. Lomin et al., 2015). Proto byly realizovány dva experimenty, které umožnily ověřit stabilitu ribosidů během jejich inkubace s receptory exprimovanými v *E. coli*. Pro tento účel byl zvolen iPR, který se na většinu PcHK potenciálně vázal s řádově nižší afinitou než *tZR* (Tab. 3, Obr. 20B). Bylo tedy možné pracovat s jeho vyššími koncentracemi a snáze tak sledovat jejich změny.

Během prvního experimentu byl iPR, v koncentraci odpovídající  $K_i$  pro daný receptor, inkubován s kulturami *E. coli* exprimujícími PcHK2, PcHK3b a PcHK4a při 4 °C po dobu 30 až 120 minut. K druhé sadě totožných vzorků byla navíc přidána rekombinantní nukleosidribohydrolasa (NRH) z kukuřice, která štěpí cytokininové ribosidy na volné báze (Kopečná et al. 2013), přičemž trojice vzorků s ní byly inkubovány také 30 minut při laboratorní teplotě jako pozitivní kontrola hydrolyzy iPR. Další kontrolou byly vzorky inkubované s iP o stejných koncentracích, jaké byla použita u iPR (25 nM pro PcHK2, 900 nM pro PcHK3b a 125 nM pro PcHK4a). Tato kontrola demonstruje, jakou odezvu během komeptice s [<sup>3</sup>H]-*tZ* bylo možné očekávat, pokud by byl veškerý iPR v ostatních vzorcích hydrolyzován (Obr. 21A). Množství ligandu navázaného na receptory během jejich inkubace s iPR při 4 °C se však ani po dvou hodinách výrazně nezměnilo. Pokud by docházelo k hydrolyze iPR v důsledku aktivity NRH uvolněných z odumřelých bakteriálních buněk, množství navázaných ligandů (a tedy vytěsněného [<sup>3</sup>H]-*tZ*) by mělo růst. Tento efekt je patrný u kontrolních vzorků inkubovaných navíc s kukuřičnou NRH, zejména po dvou hodinách při 4 °C nebo po 30 minutách za laboratorní teploty (Obr. 21A). Ani za těchto podmínek však nebylo dosaženo hodnot stanovených pro kontroly inkubované s iP.



Druhý experiment byl založen na UHPLC-MS/MS stanovení koncentrace iP a iPR v reakční směsi po inkubaci bakteriální kultury exprimující PcHK4a se 125 nM iPR. Izolaci cytokininů z kultivačního média a finální UHPLC-MS/MS analýzy provedl kolega Mgr. Ondřej Vrobel společně s mým školitelem doc. RNDr. Petrem Tarkowským, Ph.D., přesto jsou tyto výsledky pro úplnost prezentovány. Po půlhodinové inkubaci při 4 °C, která odpovídá standardnímu provedení všech kompetičních testů, byla koncentrace iP vzniklého hydrolyzou přidaného množství iPR stanovena přibližně na 7 nM (Obr. 21B). U vzorků inkubovaných současně s NRH za laboratorní teploty byla přítom konverze iPR na iP přibližně 50%. Po dosažení 7 nM koncentrace iP do rovnice odpovídající křivky pro

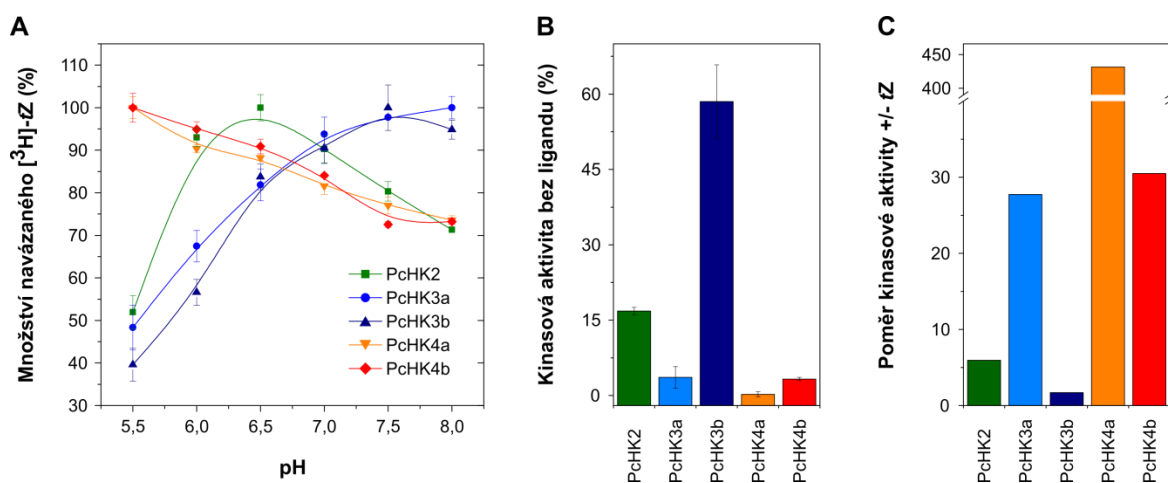


**Obrázek 21** Stabilita iPR v průběhu kompetičního vazebného testu s PcHK2, PcHK3b a PcHK4a. Graf prezentující relativní vazbu iP a iPR v průběhu jejich 30-120 minutové inkubace s *E. coli* exprimujícími příslušné receptory (A). Přerušované čáry naznačují výsledek očekávaný v případě, kdy by byl hydrolyzován veškerý přítomný iPR na iP. Koncentrace iP a iPR, stanovená pomocí UHPLC-MS/MS, přítomná v reakční směsi po 30 min inkubace iPR s *E. coli* exprimující PcHK4a (B). Přerušovaná čára indikuje původní koncentraci iPR (125 nM) přidanou do reakce. Relativní podíl iP na množství ligandu vázaného na PcHK4a (C) vypočítaný na základě jeho koncentrace v reakční směsi (panel B) dosazené do rovnice příslušné křivky stanovené kompeticí s [<sup>3</sup>H]-tZ (Obr. 20B). Část vzorků byla inkubována za přítomnosti nukleosidribohydrolasy (NRH) jako pozitivní kontroly hydrolyzy iPR. Zkratka LT označuje vzorky inkubované při laboratorní teplotě, ostatní vzorky byly inkubovány při 4 °C. Použité koncentrace ligandů odpovídaly hodnotám  $K_i$  pro iPR a daný receptor. Všechny inkubace byly provedeny při pH 7,0.

PcHK4a získané během competičního testu pak vychází, že toto množství iP by dokázalo saturovat receptor pouze ze 17 % (Obr. 21C). Zbylé množství ligandů navázaného na PcHK4a během pozorované poloviční saturace po inkubaci se 125 nM iPR (Obr. 21A) tedy musí odpovídat právě ribosidu. Naopak při inkubaci s NRH se iP uvolněné hydrolyzou podílí na celkovém množství ligandů vázaných na receptor ze 60 % (Obr. 21C).

Dále bylo ověřeno pH optimum všech receptorů na základě stanovení množství navázaného [<sup>3</sup>H]-tZ během inkubace v sadě MES a MOPS pufrů pokrývajících rozmezí pH 5,5-8,0 (Obr. 22A). PcHK2 váže cytokininy nejsilněji při pH 6,5, zatímco dvojice paralogů pak vykazují opačné trendy. Množství [<sup>3</sup>H]-tZ navázaného na PcHK3 se vzrůstajícím pH pozvolna stoupalo. V případě PcHK4 byla vazba naopak nejsilnější při pH 5,5 a množství vázaného [<sup>3</sup>H]-tZ v celém testovaném rozmezí pH lineárně klesalo.

Pro transdukcii cytokininového signálu je nepostradatelná kinasová aktivita receptorů, kterou je v *E. coli* kmene KMI001 možné monitorovat prostřednictvím indukce reportérového genu pro β-galaktosidasu štěpící fluorogenní substrát. Všech pět PcHK bylo



**Obrázek 22** Vliv pH na vazbu [<sup>3</sup>H]-tZ na jednotlivé receptory (A) stanovený s využitím sady 100 mM MES a MOPS pufrů. Kinasová aktivita receptorů bez navázaného ligandu (B) relativně vztahovaná k maximální aktivitě v přítomnosti 1 μM tZ. Poměr maximální kinasové aktivity receptorů a aktivity v nepřítomnosti ligandu (C). Absolutní hodnoty detekované fluorescence byly normalizovány na optickou hustotu bakteriální kultury a čas inkubace s ligandem (fluorescence × OD<sub>600</sub><sup>-1</sup> × h<sup>-1</sup>). Dvojice průměrů se směrodatnými odchylkami (n = 6) normalizovaných hodnot stanovených v nepřítomnosti, respektive v přítomnosti 1 μM tZ, jsou následující: 358 ± 16 a 2128 ± 371 pro PcHK2, 11 ± 6 a 294 ± 53 pro PcHK3a, 3817 ± 477 a 6522 ± 515 pro PcHK3b, 6 ± 14 a 2795 ± 83 pro PcHK4a, 13 ± 1 a 398 ± 44 pro PcHK4b.

během inkubace příslušných bakteriálních kultur s *tZ* schopno aktivovat navazující signální dráhu, jedná se tedy o funkční HK. Každý z receptorů také vykazuje určitou míru kinasové aktivity i bez navázaného ligandu (tzv. „background kinase activity“), která u PcHK3b dosahuje téměř 60 % maximální aktivity, stanovené v přítomnosti 1  $\mu$ M *tZ* (Obr. 22B). Nárůst kinasové aktivity po vazbě *tZ* je nejvyšší u PcHK4a, oproti stavu bez navázaného ligandu se aktivita kinasové domény zvýší více než 400x. Míra aktivace je naopak nejnižší u PcHK2 a zejména PcHK3b, dosahuje pouze šestinásobu, respektive dvojnásobku hodnoty stanovené v nepřítomnosti ligandu (Obr. 22C).

## 7 DISKUZE

Prezentovaná disertační práce je tématicky členěna do tří okruhů: 1) Výběr topolu druhu *P. × canadensis* (cv. *Robusta*) jako modelového organismu pro studium aromatických cytokininů a snaha o odvození jeho *in vitro* kultury. 2) Klonování a charakterizace topolových IPT katalyzujících klíčový krok biosyntézy isoprenoidních cytokininů. 3) Klonování a charakterizace topolových HK receptorů rozpoznávajících cytokininy. Záměrem, který všechny tři části volně spojuje, byla snaha o rozšíření poznatků o aromatických cytokininech, doposud málo prostudované skupině rostlinných hormonů.

Aromatické cytokininy byly poprvé identifikovány v listech *P. × canadensis* (Horgan et al. 1975; Strnad et al. 1992, 1994, 1997), který byl pro další práci zvolen jako nejvýhodnější model. Na rozdíl od řady dalších organismů se u něj podařilo opakovaně potvrdit přítomnost *oT* a *oTR* a navíc bylo snadné získat čerstvý rostlinný materiál. Na základě literárních údajů byl obsah aromatických cytokininů, ale nikoliv jejich 2-methylthio- nebo methoxy- derivátů, analyzován pomocí UHPLC-MS/MS také ve vzorcích buněčné suspenzní kultury *Ch. rubrum* (Doležal et al. 2002) a bakterie *A. tumefaciens* (Tarkovská et al., 2003). Za daných kultivačních podmínek však nebyly aromatické cytokininy detekovány. V laboratoři byly dostupné tři kmeny bakterie *R. fascians* produkující 2-methylthio-*cZ* (Pertry et al. 2009), které byly pro zajímavost analyzovány také, avšak s negativním výsledkem. Domnělé sinice druhu *P. viridis* (záměna vzorků odesilatelem), které by měly aromatické cytokininy rovněž obsahovat (Ördög et al. 2004), byly charakterizovány studentkou (Juříková 2016). Aromatické cytokininy v nich sice byly detekovány, ale jejich nízká koncentrace byla pro další práci nevyhovující.

Pro špatnou dostupnost biologického materiálu nebo komplikovanou manipulaci s ním byly rovnou vyloučeny další organismy, u nichž se aromatické cytokininy v minulosti podařilo detekovat. Jmenovitě se jednalo o plody kaly (Chaves das Neves a Pais, 1980a, b), hálky na rajčeti způsobené infekcí *A. tumefaciens* (Nandi et al. 1989a, b), palmový olej (Jones et al. 1996) a některé druhy mořských řas (Stirk et al. 2003). Značného množství *meta*-topolinu bylo také detekováno v několika kultivarech brambor pěstovaných *in vitro* (Baroja-Fernández et al. 2002), ale tyto experimenty se již dříve nepodařilo úspěšně opakovat (Berková 2012).

Hladiny *oT* a *oTR* stanovené pomocí UHPLC-MS/MS v listech mladých stromů *P. × canadensis* v létě roku 2014 vykazovaly dynamiku v závislosti na délce osvitů. Množství *oT* kulminovalo 2,5 hodiny a *oTR* pak 7 hodin po východu slunce, obě přibližně na hladině 11 pmol g<sup>-1</sup> FW. Toto množství řádově odpovídalo koncentraci aromatických cytokininů stanovené o rok později ve výmladcích rodičovského stromu (Jaworek et al. 2019b). Podobná dynamika hladiny *oTR* v závislosti na expozici stromů červenému světlu pak byla zaznamenána již nedlouho po jeho objevu (Hewett a Wareing, 1973). Ve vzorcích listů dospělého topolu, které byly analyzovány v roce 2015, byl nárůst hladin mnohem výraznější než u stromů mladých – koncentrace *oT* stoupla 4 hodiny po osvitě až na úroveň 250 pmol g<sup>-1</sup> FW (Jaworek et al. 2019a). Množství aromatických cytokininů v listech téhož dospělého stromu se však v roce 2017 pohybovalo blízko limitu kvantifikace analytické metody (Jaworek et al. 2019b). Značná variabilita v hladinách cytokininů byla meziročně i v rámci jedné sezóny pozorována také u příbuzného druhu *Populus tremula* (Edlund et al. 2017). V případě koncentrace aromatických cytokininů má vliv i stáří stromu.

Podařilo se potvrdit pilotní měření provedená Mgr. Kateřinou Podlešákovou, Ph.D. ukazující, že *oTR* je vázán v tRNA izolované z *P. × canadensis*. Po elektroforetické analýze vzorků izolované tRNA byly na agarosovém gelu po obarvení viditelné pásy velikostí odpovídající přibližně 250 bp (Obr. 11A), přičemž očekávaná velikost tRNA byla do 100 bp. Tento problém byl konzultován s Dr. Klausem von Schwartzbergem (University of Hamburg, Německo), který se věnuje problematice cytokininů vázaných v tRNA. Jeho vysvětlením je, že nepřítomnost denaturačních podmínek vedla k rozdílnému chování DNA markeru a tRNA během elektroforetické separace. Problematika *oTR* vázaného v tRNA byla dále rozpracována ve spolupráci s kolegy, kteří jej později identifikovali také ve vzorcích z listů *Populus deltoides*, jednoho z rodičovských druhů hybridního topolu *P. × canadensis*. Dokonce se ukázalo, že listy *P. deltoides* obsahují i značná množství volného *oT* a *oTR* podléhající dynamice v závislosti na délce osvitů. Tyto změny v hladinách volných aromatických cytokininů však nekorelovaly s množstvím *oTR* vázaného v tRNA, jeho koncentrace zůstávala stabilní (Jaworek et al. 2019a). Zdá se proto nepravděpodobné, že degradace tRNA je výhradním zdrojem *oTR* v topolu, jak je tomu v případě cytokininů *cZ*-typu v *Arabidopsis* (Miyawaki et al. 2006).

V čerstvé kalusové kultuře *P. × canadensis* byly detekovány překvapivě vysoké koncentrace BAP a jeho cukerných konjugátů, které však po několikerém pasážování zcela vymizely. Existuje podezření, že během odvozování kultury na pracovišti VÚLHM došlo k její kontaminaci BAP. Alternativně ho kalusy mohly přestat produkovat v důsledku stárnutí kultury. Nové kalusy se již z VÚLHM získat nepodařilo a snaha o jejich odvození přímo na pracovišti také nebyla úspěšná, experiment proto nemohl být zopakován. Explantáty *P. × canadensis* po přenosu do *in vitro* podmínek ztrácely chlorofyl a brzy umíraly.

Kalusy také obsahovaly *oT* a *oTR*, nicméně jejich koncentrace byly řádově nižší (méně než 1 pmol g<sup>-1</sup> FW) než v listech mladých stromů. Toto množství bylo pro další práci shledáno jako nedostatečné. Původním záměrem při odvozování kalusů totiž bylo následné provedení experimentů, během kterých měly být ke kultuře přidávány různé meziprodukty rostlinného aromatického metabolismu. Případné zabudování radioaktivní značky do *oT* mělo umožnit identifikaci prekurzoru jeho postranního řetězce. Pracovní hypotézou bylo, že prekurzorem je některý z meziproduktů šikimátové nebo navazující fenylypropanoidové dráhy, které produkují právě aromáty substituované v polohách *ortho* nebo *para* (např. Macholán 2003). Byly proto stanoveny koncentrace vybraných fenolických kyselin jakožto indikátorů, do jaké míry jsou tyto metabolické dráhy v kalusech zachovány. Oproti listům bylo množství fenolických kyselin v kalusech dramaticky sníženo, což mohlo mít vliv na nízký obsah *oT* a *oTR* z důvodu nedostupnosti potenciálního prekurzoru.

Četné nezdary s *in vitro* kulturami topolu vedly k přehodnocení dalšího postupu. Bylo rozhodnuto charakterizovat topolové IPT. Všech devět *PcIPT* genů bylo klonováno a přesná znalost jejich sekvencí následně umožnila analýzu jejich exprese a zhodnocení fylogenetické příbuznosti s IPT dalších rostlin. *PcIPT3* obsahuje C-koncový motiv CLVA, který je u orthologu z *Arabidopsis* rozpoznáván farnesyltransferasou a ovlivňuje subcelulární lokalizaci proteinů (Galichet et al. 2008). Silná exprese *PcIPT3* v dospělých listech a naopak nepřítomnost jeho transkriptů v mladých listech je podobná jako v případě *SIIPT3* z rajčete (Žižková et al. 2015). Paralogy *PcIPT5* jsou příbuzné *AtIPT5* a *AtIPT7*, které se u *Arabidopsis* zdají být méně významné, jelikož hladiny cytokininů zůstaly u jejich dvojitého mutanta nezměněny (Miyawaki et al. 2006). Toto však u topolu pravděpodobně

neplatí, *PcIPT5a* byl nejsilněji exprimovaným *IPT* genem v mladých listech a kořenech a příslušný protein byl navíc *in vivo* vysoce aktivní (Jaworek et al. 2019a).

Zatímco *PcIPT6a* je exprimován jen velice slabě, značné množství transkriptů *PcIPT6b* bylo detekováno zejména ve květech *P. × canadensis*. Stejný expresní profil obou paralogů *IPT6* byl zaznamenán u *P. tremula* (Sundell et al. 2015) a *P. trichocarpa* (Yang et al. 2008), data z rozsáhlé analýzy jejich genové exprese na čípech lze prohlížet na portálu PopGenIE (<https://popgenie.org>). Také *AtIPT1*, *AtIPT4*, *AtIPT6* a *AtIPT8*, které patří do stejné fylogenetické větve jako *PcIPT6*, jsou exprimovány hlavně ve květech *Arabidopsis* (Miyawaki et al. 2004). Paralogní geny *PcIPT7* pak nebyly ve studovaných orgánech exprimovány vůbec nebo jen extrémně slabě, což platí i pro *P. tremula* a *P. trichocarpa*. Naopak *PcIPT9* byl poměrně silně exprimován napříč všemi orgány včetně kalusů, u kterých je exprese všech ostatních *PcIPT* velmi nízká. Důvodem je nejspíš jejich kultivace na médiu obsahujícím *tZ*. Exogenní aplikace cytokininů vedla k negativní regulaci exprese adenylátových *IPT*, ale nikoliv tRNA *IPT*, také u *Arabidopsis* (Miyawaki et al. 2004) a kukuřice (Vyrubalová et al. 2009).

Přestože většina *PcIPT* byla v *E. coli* exprimována a identita příslušných proteinů byla ověřena, *PcIPT* agregovaly do inkluzních tělísek. Podobný problém se v minulosti podařilo vyřešit kultivací *E. coli* za podmínek osmotického stresu (Blackwell a Horgan, 1991), v případě *PcIPT* však tento přístup nepomohl. Nízká rozpustnost rekombinantních *IPT* produkovaných v *E. coli* byla zaznamenána také například u některých enzymů z rajčete (Žižková et al. 2015). Kromě snahy o optimalizaci podmínek kultivace a lýze bakteriálních buněk bylo bez žádoucího výsledku vyzkoušeno i několik postupů solubilizace a opětovného skládání rekombinantních *PcIPT*. Pro nedostatek času byla tato problematika nakonec opuštěna. V budoucnu je možné vyzkoušet použití expresních vektorů, které umožňují koexpresi cílového genu s eukaryotními chaperony, nebo *PcIPT* produkovat ve kvasinkách. Alternativně mohou být vyzkoušeny jiné podmínky purifikace nebo solubilizace, například *IPT* z chmele pomohla stabilizovat přítomnost ATP v dialyzačním pufru (Chu et al. 2010).

Funkčnost části *PcIPT* byla ověřena *in vivo* po jejich estradiolem indukované expresi v transgenních liniích *Arabidopsis*. Můj příspěvkem k této části práce byla kromě selekce homozygotních linií také ověření přítomnosti rekombinantních *PcIPT* v indukovaných

roślinách a sledování jejich fenotypu. Kolegové pak analyzovali expresi genů *PcIPT* a změny v hladinách cytokininů (Jaworek et al. 2019a). Výsledky se vzájemně doplňují a jsou proto diskutovány společně. *PcIPT9* byla schopná komplementovat fenotyp mutantu *atipt2 9*, do kterého byla vnesena. Gen byl exprimován i bez předchozí indukce estradiolem, která jeho expresi dále zvýšila přibližně 100x. Bazální exprese *PcIPT9* před indukcí byla dostatečná pro navrácení koncentrace iPR vázaného v tRNA na úroveň WT rostlin. Koncentrace vázaného cZR však zůstala oproti WT snižená. Za tuto modifikaci nejspíš odpovídá hlavně *PcIPT2*, podobně jako je tomu u jejího orthologu z *Arabidopsis* (Miyawaki et al. 2006).

Největší nárůst koncentrací isoprenoidních cytokininů včetně cZR monofosfátu byl pozorován u linií exprimujících *PcIPT5a* a oba paralogy *PcIPT6* (Jaworek et al. 2019a). Na úrovni proteinů bylo detekováno relativně malé množství *PcIPT5a*, což ve spojitosti s množstvím cytokininů kvantifikovaných v příslušných rostlinách ukazuje na jeho vysokou aktivitu. Kontinuálně indukované rostliny nesoucí geny *PcIPT5a* a *PcIPT6a* měly také nejvýraznější fenotyp, který odpovídal mutantům *Arabidopsis* nadexprimujícím *AtIPT8* (Sun et al. 2003). Rostliny měly velmi krátký primární kořen bez větvení, zpomalený vývoj nadzemní části a malé listy.

Zvýšená hladina cytokininů cZ-typu byla překvapivá, neboť jejich výhradním zdrojem je u *Arabidopsis* degradace tRNA (Miyawaki et al. 2006). Původ postranního řetězce cZ přitom není znám, ale přímé zapojení *PcIPT5a* nebo paralogů *PcIPT6* do produkce cZ nelze vyloučit. Je také možné, že při 1000x vyšších koncentracích iPR monofosfátu, než jaké jsou běžné pro WT, docházelo k jeho hydroxylaci v poloze *cis* doposud neidentifikovaným cytochromem P450. Popsané CYP735A1 a CYP735A2 jsou totiž stereospecifické a podílí se výhradně na produkci cytokininů tZ-typu (Takei et al. 2004). Alternativní vysvětlení je *trans-cis* isomerace tZR monofosfátu, který byl v indukovaných rostlinách linie *PcIPT6a\_8-3* přítomen v koncentraci  $1015 \pm 61$  pmol g<sup>-1</sup> FW. Takové množství může napomáhat průběhu isomerace v opačném směru, než je preferován (Bassil et al. 1993; Hluska et al. 2017). Transgenní linie *Arabidopsis* nesoucí gen *PcIPT6a* by mohly v budoucnu posloužit jako model pro objasnění biosyntézy cZ.

V žádné z transgenních linií nebyl detekován oT a oTR, ať už volný nebo vázaný v tRNA. *Arabidopsis* může na rozdíl od topolu postrádat vhodný aromatický prekurzor

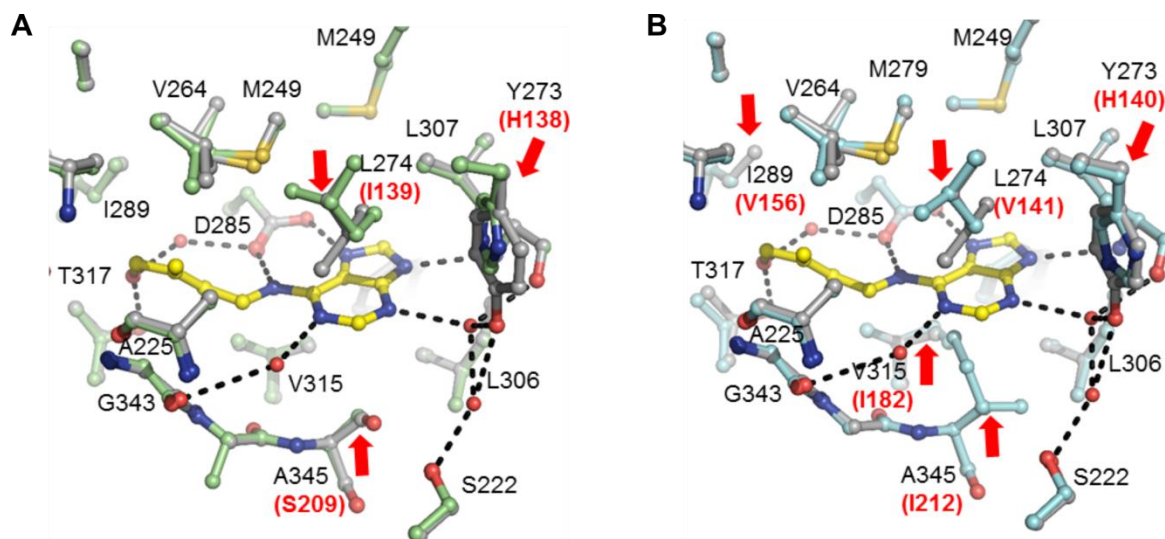


nebo další enzymy nezbytné pro jeho transformaci na substrát PcIPT. Jejich účast na biosyntéze aromatických cytokininů se však nezdá pravděpodobná i s ohledem na strukturu aktivního místa. Modely PcIPT zkonstruované na základě struktury chmelové IPT jako templátu ukazují, že vazbě potenciálního aromatického substrátu by stericly bránilo reziduum Ile220 (Obr. 14D).

Přítomnost *oT* a *oTR* v topolu vedla k rozhodnutí charakterizovat jeho HK receptory a zjistit, jaká je jejich afinita k aromatickým cytokininům. Topol obsahuje celkem pět cytokininových receptorů, zatímco *Arabidopsis* pouze tři (Ueguchi et al. 2001). Jejich větší počet je důsledkem duplikace genomu u čeledi vrbovitých, ze které v genomu topolu dodnes zůstává přibližně 8000 paralogních genů (Tuskan et al. 2006) včetně dvojic *PcHK3* a *PcHK4*. Evoluce paralogních genů často vede k jejich funkční diverzifikaci, což se mohlo stát v případě paralogů *PcHK4*, které se značně liší svým expresním profilem. Zatímco *PcHK4a* byl podobně jako *AHK4* (Higuchi et al. 2004) silně exprimován v kořenech, exprese *PcHK4b* byla celkově slabá s výjimkou květů. *PcHK2* a paralogy *PcHK3* pak jsou relativně silně exprimovány napříč všemi studovanými orgány. Fylogenetická analýza dále ukazuje, že k sobě mají evolučně blíže než k *PcHK4*. Expresní profil *PcHK* velmi dobře koreluje s expresí receptorů jabloně, které byly studovány nedávno (Daudu et al. 2017).

Všech pět *PcHK* genů se podařilo klonovat a exprimovat v *E. coli* v aktivním stavu, což je poměrně vzácné. Například *AHK2* v tomto heterologním expresním systému běžně nefunguje (Spíchal et al. 2004; Stolz et al. 2011) a kompletní receptor byl charakterizován pouze v mikrosomální frakci buněk tabáku (Lomin et al. 2015). Hodnoty  $K_D$  pro *tZ* se u všech topolových receptorů pohybují v rozmezí 1,5 – 5,0 nM podobně jako v případě *Arabidopsis* (Romanov et al. 2006; Lomin et al. 2015), řepky (Kuderová et al. 2015) nebo brambor (Lomin et al. 2018). Obecně vysoká citlivost *PcHK2* k cytokininům je srovnatelná s orthologním receptorem jabloně (Daudu et al. 2017). Podobně jako *PcHK3* váže *iP* a *iPR* relativně slabě například i *AHK3* (Romanov et al. 2006), naopak všechny receptory z brambor mají k *iP* značnou afinitu (Lomin et al. 2018).

Jediným rozdílem mezi vazebným místem PcHK4 a AHK4 je záměna Leu274 za Ile (číslování podle AHK4). Struktura vazebného místa PcHK2 se pak od AHK4 liší navíc záměnami Tyr273 za His a zejména Ala345 za Ser (Obr. 23A), která umožňuje vznik nové vodíkové vazby s atomem dusíku cytokininové báze nebo hydroxylovou skupinou případného ribosidu. Tato dodatečná stabilizace vazby ligandu se u PcHK2 odráží na nižších hodnotách  $K_i$ , než jaké byly stanoveny pro PcHK4 (Tab. 3). Oba paralogy PcHK3 se od AHK4 liší celkem pěti záměnami ve vazebném místě, nicméně nejpodstatnější jsou Val315 za Ile a Ala345 za Ile (Obr. 23B). Pod rovinu tvořenou purinem se tak dostávají dvě podstatně větší rezidua, která překážejí vazbě cytokininu v pozici běžné u AHK4 (Hothorn et al. 2011). Pravděpodobně dochází k posunu ligandu blíže k postrannímu řetězci protilehlého Val141 (číslování podle PcHK3a; záměna za Leu274 ve struktuře AHK4). Výsledkem je destabilizace vazby a podstatně nižší afinita většiny studovaných cytokininů k PcHK3 než ke zbývajícím třem receptorům (Tab. 3). Tento rozdíl je nejvíce patrný u slabě vázaného *iP*, zatímco afinita *tZ* k PcHK3 zůstává velmi vysoká. Vysvětlením je přítomnost hydroxylové skupiny na postranním řetězci *tZ* a *tZR*, která tvoří vodíkovou vazbu s reziduem Thr317 a kompenzuje tím sterický efekt obou Ile.



**Obrázek 23** Porovnání struktur vazebného místa AHK4 (šedá) s modely PcHK2 (zelená; **A**) a PcHK3a (modrá; **B**). Modely byly vytvořeny pomocí serveru Swiss-model podle struktury CHASE domény AHK4 (PDB ID: 3T4L) s navázaným *tZ* (žlutá) jako templátu. Obrázky struktur byly vygenerovány a editovány v programech PyMol a Inkscape. Číslování reziduí se v obou panelech řídí sekvencí AHK4; záměny jsou zvýrazněny červeně a označeny šipkou.

Z aromatických cytokininů je nejlepším ligandem topolových receptorů *mT* se značným odstupem následovaný BAP, jejichž přítomnost v topolu je však neprůkazná. PcHK2 váže aromatické cytokininy nejlépe, což platí i pro její orthology z řepky (Kuderová et al. 2015) nebo *Arabidopsis* (Romanov et al. 2006; Lomin et al. 2015). Většina studií rostlinných cytokininových receptorů nezahrnuje *oT* ani *oTR*, jelikož jejich schopnost aktivovat HK je obecně velice nízká (Spíchal et al. 2004). Za fyziologických podmínek může být potenciálně schopná vázat *oT* jen PcHK2 ( $K_i = 1100 \pm 118$  nM) a případně podstatně slaběji ještě PcHK4b ( $K_i = 2820 \pm 346$  nM). Koncentrace *oT* v dospělých listech *P. × canadensis* může dosáhnout koncentrace až 250 nM (Jaworek et al. 2019a), což v případě PcHK2 odpovídá přibližně 20% saturaci receptoru. Schopnost *oT* aktivovat cytokininovou signalizaci *in vivo* se však nepodařilo prokázat (Jaworek et al. 2019b). Tyto výsledky společně s výraznými fluktuacemi hladin *oT* a *oTR* a pravděpodobně oddělenou biosyntetickou drahou podporují předpoklad, že aromatické cytokininy mají v topolu jinou funkci než ty isoprenoidní (Strnad 1997).

Schopnost HK vázat cytokininové ribosidy byla zpochybněna na základě stanovení kinetických parametrů receptorů v mikrosomální frakci rostlinných buněk (Lomin et al. 2015). Kontaminace mikrosomů cytosolárními enzymy, které mohly ribosidy během inkubace modifikovat, však nebyla ověřena. Autoři této studie dále argumentují, že ve struktuře CHASE domény AHK4 není pro ribosidy dostatek místa (Hothorn et al. 2011). Do svých úvah však nezahrnuli možnost indukovaného přizpůsobení vazebného místa ligandu. Podobně jako u CKX z kukuřice může navíc při vazbě ribosidu dojít k přetočení adeninové báze okolo osy tvořené isoprenoidním postranním řetězcem (Malito et al. 2004; Kopečný et al. 2016). Bylo tedy nutné ověřit, zda jsou cytokininové ribosidy skutečnými ligandy PcHK, nebo zda v průběhu inkubace s kulturami *E. coli* dochází k jejich štěpení na volné báze působením NRH. Množství ligandu navázaného na PcHK se během dvouhodinové inkubace s iPR neměnilo, standardně délka inkubace při kompetičních testech přitom byla pouhých 30 minut. Pokud by docházelo k výraznější hydrolyze iPR na iP, který má k receptorům vyšší afinitu, množství navázaného ligandu by s časem pozvolna rostlo (Obr. 21A). Pomocí UHPLC-MS/MS byla stanovena koncentrace iP a iPR v reakční směsi. Množství detekovaného iP nebylo samo o sobě schopné vytěsnit 50 % [<sup>3</sup>H]-*tZ* (pozorovaná odezva), zbývajícím ligandem tedy

musel být iPR (Obr. 21B,C). Receptory z *Arabidopsis* a kukuřice jsou navíc schopné vázat iP fluorescenčně značený 7-nitrobenzofurazanem (iP-NBD), který je stejně jako ribosid vázán v poloze N<sup>9</sup> (Kubiasová et al. 2018).

Jednotlivé PcHK se vzájemně liší pH optimem a mírou kinasové aktivity v závislosti na navázaném ligandu. Zatímco oba paralogy PcHK4 váží cytokininy nejlépe ve slabě kyselém pH, zbývající tři receptory mají pH optima posunutá do neutrálních až slabě bazických hodnot. Z toho je možné usuzovat na jejich subcelulární lokalizaci v cytoplasmatické membráně (pH v apoplastu je ~5,5), respektive v endoplasmatickém retikulu (Romanov et al. 2018). PcHK3b se pak vyznačuje vysokou kinasovou aktivitou i bez přítomnosti ligandu podobně jako jeho orthology z jabloně (Daudu et al. 2017) nebo AHK2 a AHK3 z *Arabidopsis* (Tran et al. 2007). Ty byly schopné komplementovat kvasinkového mutanta *sln1*, který postrádá příslušný HK osmosenzor a za podmínek osmotického stresu hyne (Inoue et al. 2001), bez přidání cytokininu do média. Mutantní varianty receptoru AHK4 označované jako *rock2* a *rock3* jsou také aktivní konstitutivně (Bartrina et al., 2017).

Pětici topolových receptorů je možné v budoucnu využít například pro podrobnější studium vazby N<sup>9</sup>- substituovaných cytokininů, zejména iP-NBD, který není hydrolyzován NRH. Pomocí cílené mutagenese mohou být identifikována aminokyselinová rezidua nezbytná pro vazbu ribosidů. Zajímavou možností je také krystalizace CHASE domény některého z receptorů s navázaným iP-NBD a následné určení jeho struktury pomocí rentgenové krystalografie. Značná homologie PcHK s receptory ovocných stromů (jabloň) dále nabízí možnost jejich využití pro testování cytokininové aktivity látek s potenciální aplikací v zemědělství. Tento koncept již byl ověřen pro dvojici nových inhibitorů CKX (Jaworek et al. 2019b).

## 8 ZÁVĚR

- Jako modelový organismus pro studium aromatických cytokininů byl vybrán *Populus × canadensis* (cv. *Robusta*). Komplikace spojené s jeho kultivací *in vitro* však znemožnily identifikaci prekursoru postranního řetězce *o*T-typu cytokininů, které topol produkuje a které jsou také součástí jeho tRNA.
- Bylo klonováno všech devět topolových *IPT* genů. Produkce příslušných rekombinantních proteinů do rozpustné fáze se v *E. coli* nezdařila z důvodu jejich agregace do inkluzních tělísek.
- Funkčnost části *PcIPT* byla prokázána po jejich indukovatelné expresi v *A. thaliana*. Transgenní linie nesoucí geny pro *PcIPT5a*, *PcIPT6a* a *PcIPT6b* produkují značná množství metabolitů *iP* a *tZ*. U těchto linií bylo překvapivě detekováno také zvýšené množství *cZ*-typu cytokininů.
- Podařilo se klonovat všech pět *PcHK* genů kódujících cytokininové receptory, které byly dále charakterizovány. Většina cytokininů včetně aromatických se nejsilněji váže na receptor *PcHK2*.
- Byla ověřena schopnost topolových receptorů vázat cytokininové ribosidy. Jednotlivé receptory se liší ve svých pH optimech a míře kinasové aktivity bez přítomnosti ligandu, která je nejvýraznější u *PcHK3b*. Nejsilněji je cytokininy naopak aktivována *PcHK4a*.

## 9 LITERATURA

- Abe I, Tanaka H, Abe T, Noguchi H (2007) Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry. *Biochem Biophys Res Commun* **355**:795–800.
- Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, et al (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:5994–5998.
- Allen M, Qin W, Moreau F, Moffatt B (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiol Plant* **115**:56–68
- Amasino R (2005) 1955: Kinetin arrives. The 50th Anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiol* **138**:1177–1184.
- Anantharaman V, Aravind L (2001) The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci* **26**:579–582.
- Aremu AO, Bairu MW, Doležal K, et al (2012) Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Org* **108**:1–16.
- Argyros RD, Mathews DE, Chiang Y-H, et al (2008) Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell* **20**:2102–2116.
- Asakura Y, Hagino T, Ohta Y, et al (2003) Molecular characterization of His-Asp phosphorelay signaling factors in maize leaves: Implications of the signal divergence by cytokinin-inducible response regulators in the cytosol and the nuclei. *Plant Mol Biol* **52**:331–341.
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, et al (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**:741–745.
- Åstot C, Doležal K, Moritz T, Sandberg G (2000) Deuterium in vivo labelling of cytokinins in *Arabidopsis thaliana* analysed by capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **35**:13–22.
- Auer CA, Cohen JD (1993) Identification of a benzyladenine disaccharide conjugate produced during shoot organogenesis in *Petunia* leaf explants. *Plant Physiol* **102**:541–545
- Ayaz FA, Hayirlioglu-Ayaz S, Gruz J, et al (2005) Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS. *J Agric Food Chem* **53**:8116–8122.
- Balibrea Lara ME, Gonzalez Garcia M-C, Fatima T, et al (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* **16**:1276–1287.
- Barciszewski J, Siboska GE, Pedersen BO, et al (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett* **393**:197–200
- Baroja-Fernández E, Aguirreolea J, Martinková H, et al (2002) Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. *Plant Physiol Bioch* **40**:217–224.
- Barry GF, Rogers SG, Fraley RT, Brand L (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:4776–4780
- Bartrina I, Jensen H, Novák O, et al (2017) Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant Physiol* **173**:1783–1797.
- Bassil NV, Mok DWS, Mok MC (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* **102**:867–872
- Béres T, Gemrotová M, Tarkowski P, et al (2012) Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme in vitro reaction. *Anal Chim Acta* **751**:176–181.
- Berková T (2012) Biosyntéza aromatických cytokininů. Diplomová práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Besnard F, Refahi Y, Morin V, et al (2014) Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature* **505**:417–421.
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, et al (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J* **11**:339–345.
- Bielecki RL (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal Biochem* **9**:431–442

- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, et al (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol* **125**:378–386.
- Bishopp A, Lehesranta S, Vatén A, et al (2011) Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Curr Biol* **21**:927–932.
- Blackwell JR, Horgan R (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* **295**:10–12.
- Blackwell JR, Horgan R (1994) Cytokinin biosynthesis by extracts of *Zea mays*. *Phytochemistry* **35**:339–342.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, et al (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**:39–44.
- Brandstatter I, Kieber JJ (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**:1009–1019.
- Brownlee BG, Hall RH, Whitty CD (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine. *Can J Biochem* **53**:37–41
- Brugière N, Humbert S, Rizzo N, et al (2008) A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 (*ZmIPT2*), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. *Plant Mol Biol* **67**:215–229.
- Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, et al (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**:1051–1054
- Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, et al (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J* **34**:13–26.
- Burrows WJ, Armstrong DJ, Kaminek M, et al (1970) Isolation and identification of four cytokinins from wheat germ transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **9**:1867–1872.
- Caesar K, Thamm AMK, Witthöft J, et al (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* **62**:5571–5580.
- Capra EJ, Laub MT (2012) The evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol* **66**:325–347.
- Carabelli M, Possenti M, Sessa G, et al (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev* **21**:1863–1868.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**:540–552.
- Cedzich A, Stransky H, Schulz B, Frommer WB (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Phys* **148**:1857–1867.
- Chandler JW, Werr W (2015) Cytokinin–auxin crosstalk in cell type specification. *Trends Plant Sci* **20**:291–300.
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**:539–544.
- Chaves das Neves HJ, Pais MSS (1980a) Identification of a spathe regreening factor in *Zantedeschia aethiopica*. *Biochem Biophys Res Commun* **95**:1387–1392.
- Chaves Das Neves HJ, Pais MSS (1980b) A new cytokinin from the fruits of *Zantedeschia aethiopica*. *Tetrahedron Lett* **21**:4387–4390.
- Chen CM, Melitz DK (1979) Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures. *FEBS Lett* **107**:15–20
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099–3108
- Choi J, Lee J, Kim K, et al (2012) Functional identification of OsHk6 as a homotypic cytokinin receptor in rice with preferential affinity for iP. *Plant Cell Physiol* **53**:1334–1343.
- Chu H-M, Ko T-P, Wang AH-J (2010) Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Res* **38**:1738–1748.
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant Mol Biol* **25**:413–427.

- Corbesier L, Prinsen E, Jacquard A, et al (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J Exp Bot* **54**:2511–2517.
- D'Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Phys* **124**:1706–1717.
- Daudu D, Allion E, Liesecke F, et al (2017) CHASE-containing histidine kinase receptors in apple tree: from a common receptor structure to divergent cytokinin binding properties and specific functions. *Front Plant Sci* **8**:1614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01614>
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, et al (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**:678–682.
- Dello Ioio R, Galinha C, Fletcher AG, et al (2012) A PHABULOSA/cytokinin feedback loop controls root growth in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **22**:1699–1704.
- Ding W, Tong H, Zheng W, et al (2017) Isolation, characterization and transcriptome analysis of a cytokinin receptor mutant *Osc1* in rice. *Front Plant Sci* **8**:88. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00088>
- Dixon SC, Martin RC, Mok MC, et al (1989) Zeatin glycosylation enzymes in *Phaseolus*: Isolation of O-glucosyltransferase from *P. lunatus* and comparison to O-xylosyltransferase from *P. vulgaris*. *Plant Physiol* **90**:1316–1321.
- Dobisová T, Hrdinová V, Cuesta C, et al (2017) Light controls cytokinin signaling via transcriptional regulation of constitutively active sensor histidine kinase CK11. *Plant Physiol* **174**:387–404.
- Doležal K, Āstot C, Hanuš J, et al (2002) Identification of aromatic cytokinins in suspension cultured photoautotrophic cells of *Chenopodium rubrum* by capillary liquid chromatography/frit – fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Growth Regul* **36**:181–189.
- Dortay H, Mehnert N, Bürkle L, et al (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* **273**:4631–4644.
- Dortay H, Gruhn N, Pfeifer A, et al (2008) Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *J Proteome Res* **7**:3649–3660.
- Durán-Medina Y, Díaz-Ramírez D, Marsch-Martínez N (2017) Cytokinins on the move. *Front Plant Sci* **8**:146. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00146>
- Edlund E, Novak O, Karady M, et al (2017) Contrasting patterns of cytokinins between years in senescing aspen leaves. *Plant Cell Environ* **40**:622–634.
- El-Showk S, Ruonala R, Helariutta Y (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* **140**:1373–1383.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:486–501.
- Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, et al (1996) The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* **10**:967–979.
- Entsch B, Letham DS (1979) Enzymic glucosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Sci Lett* **14**:205–212.
- Entsch B, Parker CW, Letham DS (1983) An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**:375–381.
- Falk A, Rask L (1995) Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading *beta*-glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiol* **108**:1369–1377.
- Feng J, Wang C, Chen Q, et al (2013) S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat Commun* **4**:1–9.
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, et al (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* **62**:2431–2452.
- Frébortová J, Fraaije MW, Galuszka P, et al (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem J* **380**:121–130.
- Frébortová J, Novák O, Frébort I, Jorda R (2010) Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *Plant J* **61**:467–481.



- Frébortová J, Plíhal O, Florová V, et al (2017) Light influences cytokinin biosynthesis and sensing in *Nostoc* (cyanobacteria). *J Phycol* **53**:703–714.
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, et al (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot* **62**:2827–2840.
- Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Gruissem W (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**:1155–1164.
- Gallie DR (2015) Ethylene receptors in plants - why so much complexity? *F1000Prime Rep* **7**:39. <https://doi.org/10.12703/P7-39>
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, et al (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur J Biochem* **268**:450–461.
- Galuszka P, Popelková H, Werner T, et al (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J Plant Growth Regul* **26**:255–267.
- Galuszka P, Spíchal L, Kopečný D, et al (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman), Elsevier, Amsterdam, NL, 203–264.
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**:1986–1988.
- Gao R, Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**:133–154.
- Gaudinová A, Dobrev PI, Šolcová B, et al (2005) The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J Plant Growth Regul* **24**:188–200.
- Gillissen B, Bürkle L, André B, et al (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**:291–300.
- Gruz J, Novák O, Strnad M (2008) Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chem* **111**:789–794.
- Gu J, Li Z, Mao Y, et al (2018) Roles of nitrogen and cytokinin signals in root and shoot communications in maximizing of plant productivity and their agronomic applications. *Plant Sci* **274**:320–331.
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, et al (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**:307–321.
- Hall RH, Csonka L, David H, McLennan B (1967) Cytokinins in the soluble RNA of plant tissues. *Science* **156**:69–71.
- Hanano S, Domagalska MA, Nagy F, Davis SJ (2006) Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes Cells* **11**:1381–1392.
- Hase E, Morimura Y, Tamiya H (1957) Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Arch Biochem Biophys* **69**:149–165.
- Hecht S, Eisenreich W, Adam P, et al (2001) Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: the role of the GcpE (IspG) protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:14837–14842.
- Hejátko J, Pernisová M, Eneva T, et al (2003) The putative sensor histidine kinase CKII is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genomics* **269**:443–453.
- Hewett EW, Wareing PF (1973) Cytokinins in *Populus × robusta* (schneid): Light effects on endogenous levels. *Planta* **114**:119–129.
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, et al (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:8821–8826.
- Hinsch J, Vrabka J, Oeser B, et al (2015) *De novo* biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*. *Environ Microbiol* **17**:2935–2951.
- Hirose N, Makita N, Yamaya T, Sakakibara H (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol* **138**:196–206.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, et al (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**:75–83.

- Hluska T, Šebela M, Lenobel R, et al (2017) Purification of maize nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase casts doubt on the existence of zeatin *cis-trans* isomerase in plants. *Front Plant Sci* **8**:1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01473>
- Horák J, Grefen C, Berendzen KW, et al (2008) The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biol* **8**:77. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-77>
- Horgan R, Hewett EW, Purse JG, Wareing PF (1973) A new cytokinin from *Populus × robusta*. *Tetrahedron Lett* **14**:2827–2828.
- Horgan R, Hewett EW, Horgan JM, et al (1975) A new cytokinin from *Populus × robusta*. *Phytochemistry* **14**:1005–1008.
- Hosoda K, Imamura A, Katoh E, et al (2002) Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* **14**:2015–2029.
- Hothorn M, Dabi T, Chory J (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat Chem Biol* **7**:766–768.
- Hou B, Lim E-K, Higgins GS, Bowles DJ (2004) N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**:47822–47832.
- Houba-Hérin N, Pethe C, d’Alayer J, Laloue M (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J* **17**:615–626
- Hughes EO, Gorham PR, Zehnder A (1958) Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can J Microbiol* **4**:225–236.
- Hüsemann W, Barz W (1977) Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant* **40**:77–81.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, et al (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**:3073–3087.
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**:383–389.
- Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, et al (1999) Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol* **40**:733–742
- Imamura A, Kiba T, Tajima Y, et al (2003) *In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **44**:122–131.
- Immanen J, Nieminen K, Silva HD, et al (2013) Characterization of cytokinin signaling and homeostasis gene families in two hardwood tree species: *Populus trichocarpa* and *Prunus persica*. *BMC Genomics* **14**:885. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-885>
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, et al (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**:1060–1063.
- Jaworek P, Kopečný D, Zalabák D, et al (2019a) Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta* **250**:229–244.
- Jaworek P, Tarkowski P, Hluska T, et al (2019b) Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins. *Planta*, přijato k publikování dne 13.10.2019
- Jeon WB, Allard STM, Bingman CA, et al (2006) X-ray crystal structures of the conserved hypothetical proteins from *Arabidopsis thaliana* gene loci At5g11950 and AT2g37210. *Proteins* **65**:1051–1054.
- Jin S-H, Ma X-M, Kojima M, et al (2013) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin responses likely through O-glycosylation. *Planta* **237**:991–999.
- Jones LH, Martinková H, Strnad M, Hanke DE (1996) Occurrence of aromatic cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Plant Growth Regul* **15**:39–49.
- Juříková S (2016) Cytokininy v řasách. Bakalářská práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Kakimoto T (1996) CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**:982–985.

- Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**:677–685.
- Kakimoto T (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu Rev Plant Biol* **54**:605–627.
- Kamínek M, Motyka V, Vaňková R (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. *Physiol Plant* **101**:689–700.
- Kang NY, Cho C, Kim J (2013) Inducible expression of *Arabidopsis* response regulator 22 (*ARR22*), a type-C ARR, in transgenic *Arabidopsis* enhances drought and freezing tolerance. *PLOS ONE* **8**:e79248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079248>
- Kang J, Lee Y, Sakakibara H, Martinoia E (2017) Cytokinin transporters: GO and STOP in signaling. *Trends Plant Sci* **22**:455–461.
- Kasahara H, Takei K, Ueda N, et al (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **279**:14049–14054.
- Kiba T, Aoki K, Sakakibara H, Mizuno T (2004) *Arabidopsis* response regulator, *ARR22*, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant. *Plant Cell Physiol* **45**:1063–1077.
- Kieber JJ, Schaller GE (2018) Cytokinin signaling in plant development. *Development* **145**:dev149344. <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, et al (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by *AHK3* through phosphorylation of *ARR2* in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:814–819.
- Klämbt D, Thies G, Skoog F (1966) Isolation of cytokinins from *Corynebacterium fascians*. *Proc Natl Acad Sci USA* **56**:52–59.
- Ko D, Kang J, Kiba T, et al (2014) *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:7150–7155.
- Kobayashi H, Morisaki N, Tago Y, et al (1997) Structural identification of a major cytokinin in coconut milk as 14-O-(3-O-[*beta*-D-galactopyranosyl-(1->2)-alpha-D-galactopyranosyl-(1->3)-alpha-L-arabinofuranosyl]-4-O-(alpha-L-arabinofuranosyl)- *beta*-D-galactopyranosyl)-*trans*-zeatin riboside. *Chem Pharm Bull* **45**:260–264
- Kopečná M, Blaschke H, Kopečný D, et al (2013) Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. *Plant Physiol* **163**:1568–1583.
- Kopečný D, Pethe C, Šebela M, et al (2005) High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *Biochimie* **87**:1011–1022.
- Kopečný D, Končítíková R, Popelka H, et al (2016) Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. *FEBS J* **283**:361–377.
- Koshimizu K, Matsubara S, Kusaki T, Mitsui T (1967) Isolation of a new cytokinin from immature yellow lupin seeds. *Agri Biol Chem* **31**:795–801.
- Kowalska M, Galuszka P, Frébortová J, et al (2010) Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry* **71**:1970–1978.
- Krall L, Raschke M, Zenk MH, Baron C (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett* **527**:315–318
- Kubiasová K, Mik V, Nisler J, et al (2018) Design, synthesis and perception of fluorescently labeled isoprenoid cytokinins. *Phytochemistry* **150**:1–11.
- Kubiasová K, Montesinos JC, Šamajová O, et al (2019) Cytokinin fluoroprobe and receptor CRE1/AHK4 localize to both plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Nat Comm* v recenzním řízení. <https://doi.org/10.1101/744177>
- Kuderová A, Gallová L, Kuricová K, et al (2015) Identification of *AHK2*- and *AHK3*-like cytokinin receptors in *Brassica napus* reveals two subfamilies of *AHK2* orthologues. *J Exp Bot* **66**:339–353.
- Kudo T, Makita N, Kojima M, et al (2012) Cytokinin activity of *cis*-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative *cis*-Zeatin-O-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol* **160**:319–331.

- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, et al (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**:652–655.
- Kuroha T, Tokunaga H, Kojima M, et al (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**:3152–3169.
- Kwade Z, Swiatek A, Azmi A, et al (2005) Identification of four adenosine kinase isoforms in tobacco By-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. *J Biol Chem* **280**:17512–17519.
- Laplaze L, Benková E, Casimiro I, et al (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**:3889–3900.
- Leibfried A, To JPC, Busch W, et al (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**:1172–1175.
- Letham DS (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci* **2**:569–573.
- Letham DS, Shannon JS, McDonald IR (1964) The structure of zeatin, a factor inducing cell division. *Proc Chem Soc* **0**:230–231.
- Letham DS, Palni LMS (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu Rev Plant Physiol* **34**:163–197.
- Letham DS, Zhang R (1989) Cytokinin translocation and metabolism in lupin species II. New nucleotide metabolites of cytokinins. *Plant Sci* **64**:161–165.
- Letham DS, Smith NG, Willcocks DA (2003) Cytokinin metabolism in *Narcissus bulbs*: chilling promotes acetylation of zeatin riboside. *Functional Plant Biol* **30**:525–532.
- Li G, Liu K, Baldwin SA, Wang D (2003) Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*. cDNA cloning, expression pattern, and analysis of transport activities. *J Biol Chem* **278**:35732–35742.
- Li J, Wang D (2000) Cloning and in vitro expression of the cDNA encoding a putative nucleoside transporter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **157**:23–32.
- Li Y, Wang B, Dong R, Hou B (2015) AtUGT76C2, an *Arabidopsis* cytokinin glycosyltransferase is involved in drought stress adaptation. *Plant Sci* **236**:157–167.
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**:47–65.
- Locher KP (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol* **23**:487–493.
- Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *J Exp Bot* **62**:5149–5159.
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MYu, et al (2015) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J Exp Bot* **66**:1851–1863.
- Lomin SN, Myakushina YA, Arkhipov DV, et al (2018) Studies of cytokinin receptor–phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. *Functional Plant Biol* **45**:192–202.
- Maaß H, Klämbt D (1981) On the biogenesis of cytokinins in roots of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **151**:353–358.
- Macholán L (2003): Biosyntéza látek s aromatickým jádrem. In: *Sekundární metabolity*. Druhé vydání (Macholán L), Masarykova Universita, Brno, CZ, 58–68.
- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, et al (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* **14**:2938–2943.
- Mähönen AP, Higuchi M, Törmäkangas K, et al (2006a) Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **16**:1116–1122.
- Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, et al (2006b) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**:94–98.

- Makino S, Matsushika A, Kojima M, et al (2001) Light response of the circadian waves of the APRR1/TOC1 quintet: when does the quintet start singing rhythmically in *Arabidopsis*? *Plant Cell Physiol* **42**:334-339.
- Malinowski R, Novák O, Borhan MH, et al (2016) The role of cytokinins in clubroot disease. *Eur J Plant Pathol* **145**:543-557.
- Malito E, Coda A, Bilyeu KD, et al (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *J Mol Biol* **341**:1237-1249.
- Martin RC, Mok MC, Shaw G, Mok DWS (1989) An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiol* **90**:1630-1635.
- Martin RC, Mok MC, Mok DW (1999a) A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **120**:553-558.
- Martin RC, Mok MC, Mok DWS (1999b) Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:284-289.
- Martin RC, Mok MC, Habben JE, Mok DW (2001) A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:5922-5926.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H (2004) A novel regulatory pathway of sulfate uptake in *Arabidopsis* roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *Plant J* **38**:779-789.
- Mason MG, Li J, Mathews DE, et al (2004) Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**:927-937.
- Massonneau A, Houba-Hérin N, Pethe C, et al (2004) Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *J Exp Bot* **55**:2549-2557.
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, et al (2008) Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:20027-20031.
- Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol* **41**:1002-1012.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, et al (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**:805-815.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* **77**:1392-1392.
- Miller CO, Skoog F, Okumura FS, et al (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J Am Chem Soc* **78**:1375-1380.
- Miller CO (1965) Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: compounds from maize which promote cell division. *Proc Natl Acad Sci USA* **54**:1052-1058.
- Miwa K, Ishikawa K, Terada K, et al (2007) Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant Cell Physiol* **48**:1809-1814.
- Miyata S, Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **437**:11-14.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**:128-138
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, et al (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:16598-16603.
- Möhlmann T, Mezher Z, Schwerdtfeger G, Neuhaus HE (2001) Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1,At). *FEBS Lett* **509**:370-374.
- Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, et al (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry* **21**:1509-1511.

- Mok DW, Mok and MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:89–118.
- Moreira S, Bishopp A, Carvalho H, Campilho A (2013) AHP6 inhibits cytokinin signaling to regulate the orientation of pericycle cell division during lateral root initiation. *PLOS ONE* **8**:e56370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056370>
- Morris RO, Blevins DG, Dietrich JT, et al (1993) Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains. *Functional Plant Biol* **20**:621–637.
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh NN (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem Biophys Res Commun* **255**:328–333.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, et al (2010) The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* **20**:1138–1143.
- Mougel C, Zhulin IB (2001) CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci* **26**:582–584.
- Müller B, Sheen J (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**:1094–1097.
- Murray JD, Karas BJ, Sato S, et al (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**:101–104.
- Nandi SK, Palni LMS, Letham DS, Wong OC (1989a) Identification of cytokinins in primary crown gall tumours of tomato. *Plant Cell Environ* **12**:273–283.
- Nandi SK, Letham DS, Palni LMS, et al (1989b) 6-benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Sci* **61**:189–196.
- Naseem M, Bencurova E, Dandekar T (2018) The cytokinin-activating LOG-family proteins are not lysine decarboxylases. *Trends Biochem Sci* **43**:232–236.
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, et al (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:20032–20037.
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, et al (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**:1365–1377.
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**:205–217.
- Novák O, Tarkowski P, Tarkowská D, et al (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **480**:207–218.
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, et al (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**:2214–2224.
- Ördög V, Stirk WA, Van Staden J, et al (2004) Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from chlorophyta. *J Phycol* **40**:88–95.
- Osugi A, Kojima M, Takebayashi Y, et al (2017) Systemic transport of *trans*-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots. *Nat Plants* **3**:17112. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.112>
- Pačes V, Werstiuk E, Hall RH (1971) Conversion of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiol* **48**:775–778
- Pernisová M, Prat T, Groner P, et al (2016) Cytokinins influence root gravitropism via differential regulation of auxin transporter expression and localization in *Arabidopsis*. *New Phytol* **212**:497–509.
- Persson BC, Björk GR (1993) Isolation of the gene (*miaE*) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-*cis*-ribozeatin in tRNA of *Salmonella typhimurium* and characterization of mutants. *J Bacteriol* **175**:7776–7785.
- Persson BC, Esberg B, Ólafsson Ó, Björk GR (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* **76**:1152–1160.
- Pertry I, Václavíková K, Depuydt S, et al (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:929–934.

- Pertry I, Václavíková K, Gemrotová M, et al (2010) *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. *Mol Plant Microbe Interact* **23**:1164–1174.
- Pischke MS, Jones LG, Otsuga D, et al (2002) An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15800–15805.
- Popelková H, Fraaije MW, Novák O, et al (2006) Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *Biochem J* **398**:113–124.
- Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**:1998–2011.
- Ribot C, Wang Y, Poirier Y (2008) Expression analyses of three members of the AtPHO1 family reveal differential interactions between signaling pathways involved in phosphate deficiency and the responses to auxin, cytokinin, and abscisic acid. *Planta* **227**:1025–1036.
- Richmond AE, Lang A (1957) Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**:650–651.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqard A, Murray JA (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**:1541–1544.
- Rittenberg D, Foster GL (1940) A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *J Biol Chem* **133**:737–744.
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, et al (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:19631–19636.
- Robischon M (2015) Do cytokinins function as two-way signals between plants and animals? Cytokinins may not only mediate defence reactions via secondary compounds, but may directly interfere with developmental signals in insects. *Bioessays* **37**:356–363.
- Rohmer M (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* **16**:565–574.
- Romanov GA, Spíchal L, Lomin SN, et al (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Anal Biochem* **347**:129–134.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot* **57**:4051–4058.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmuelling T (2018) Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytol* **218**:41–53.
- Rupp HM, Frank M, Werner T, et al (1999) Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J* **18**:557–563.
- Sakai H, Honma T, Aoyama T, et al (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**:1519–1521.
- Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, et al (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:9972–9977.
- Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**:431–449.
- Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M, et al (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiol* **142**:54–62.
- Sakano Y, Okada Y, Matsunaga A, et al (2004) Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**:2439–2446.
- Sasaki T, Suzaki T, Soyano T, et al (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat Commun* **5**:4983. <https://doi.org/10.1038/ncomms5983>
- Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* **51**:660–672.
- Schenk PW, Snaar-Jagalska BE (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta* **1449**:1–24.
- Scheres B, Laurenzio LD, Willemsen V, et al (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**:53–62

- Schmülling T, Werner T, Riefler M, et al (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J Plant Res* **116**:241–252.
- Schnorr KM, Gaillard C, Biget E, et al (1996) A second form of adenine phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana* with relative specificity towards cytokinins. *Plant J* **9**:891–898.
- Séguéla M, Briat J-F, Vert G, Curie C (2008) Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in *Arabidopsis* through a growth-dependent pathway. *Plant J* **55**:289–300.
- Seif E, Hallberg BM (2009) RNA-protein mutually induced fit: structure of *Escherichia coli* isopentenyl-tRNA transferase in complex with tRNA(Phe). *J Biol Chem* **284**:6600–6604.
- Shantz EM, Steward FC (1955) The identification of compound a from coconut milk as 1,3-Diphenylurea. *J Am Chem Soc* **77**:6351–6353.
- Skoog F, Strong FM, Miller CO (1965) Cytokinins. *Science* **148**:532–533.
- Šmehilová M, Galuszka P, Bilyeu KD, et al (2009) Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *J Exp Bot* **60**:2701–2712.
- Šmehilová M, Dobrušková J, Novák O, et al (2016) Cytokinin-specific glycosyltransferases possess different roles in cytokinin homeostasis maintenance. *Front Plant Sci* **7**: 1264. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01264>
- Sondheimer E, Tzou D-S (1971) The metabolism of hormones during seed germination and dormancy. *Plant Physiol* **47**:516–520
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, et al (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* **45**:1299–1305.
- Spíchal L (2011) Bacterial assay to study plant sensor histidine kinases. In: *Plant Kinases: Methods and Protocols* (Dissmeyer N, Schnittger A), Humana Press, Totowa, NJ, USA 139–147.
- Stirk WA, Novák O, Strnad M, Van Staden J (2003) Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regul* **41**:13–24.
- Stirk WA, Staden J van (2010) Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regul* **62**:101–116.
- Stirk WA, Václavíková K, Novák O, et al (2012) Involvement of *cis*-zeatin, dihydrozeatin, and aromatic cytokinins in germination and seedling establishment of maize, oats, and lucerne. *J Plant Growth Regul* **31**:392–405.
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, et al (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J* **67**:157–168.
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, et al (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**:768–771.
- Strnad M, Peters W, Beck E, Kamínek M (1992) Immunodetection and identification of N<sup>6</sup>-(*o*-hydroxybenzylamino)purine as a naturally occurring cytokinin in *Populus × canadensis* Moench cv *Robusta* leaves. *Plant Physiol* **99**:74–80
- Strnad M, Peters W, Hanuš J, Beck E (1994) *Ortho*-topolin-9-glucoside, an aromatic cytokinin from *Populus × canadensis* cv *Robusta* leaves. *Phytochemistry* **37**:1059–1062.
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* **101**:674–688.
- Strnad M, Hanus J., Vanek T., et al (1997) *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus × canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry* **45**:213–218.
- Sugawara H, Ueda N, Kojima M, et al (2008) Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:2734–2739.
- Sun J, Niu Q-W, Tarkowski P, et al (2003) The *Arabidopsis* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol* **131**:167–176.
- Sun J, Hirose N, Wang X, et al (2005) *Arabidopsis* *SOI33/AtENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in planta. *J Integr Plant Biol* **47**:588–603.
- Sundell D, Mannapperuma C, Netotea S, et al (2015) The plant genome integrative explorer resource: PlantGenIE.org. *New Phytol* **208**:1149–1156.
- Suzuki T, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T (1998) Histidine-containing phosphotransfer (Hpt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **39**:1258–1268



- Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, et al (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:2486–2489.
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, et al (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* **42**:107–113.
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, et al (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**:1108–1111.
- Takeda S, Fujisawa Y, Matsubara M, et al (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC → YojN → RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol* **40**:440–450.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**:26405–26410.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol* **42**:85–93.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004) *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. *J Biol Chem* **279**:41866–41872.
- Talla SK, Panigrahy M, Kappara S, et al (2016) Cytokinin delays dark-induced senescence in rice by maintaining the chlorophyll cycle and photosynthetic complexes. *J Exp Bot* **67**:1839–1851.
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, et al (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J* **45**:1028–1036.
- Tarkowská D, Doležal K, Tarkowski P, et al (2003) Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus × canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol Plant* **117**:579–590.
- Taya Y, Tanaka Y, Nishimura S (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**:545–547.
- Taylor JS, Koshioka M, Pharis RP, Sweet GB (1984) Changes in cytokinins and gibberellin-like substances in *Pinus radiata* buds during lateral shoot initiation and the characterization of ribosyl zeatin and a novel ribosyl zeatin glycoside. *Plant Physiol* **74**:626–631.
- Temmerman W, Vereecke D, Dreesen R, et al (2000) Leafy gall formation is controlled by *fasR*, an *AraC*-type regulatory gene in *Rhodococcus fascians*. *J Bacteriol* **182**:5832–5840.
- To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, et al (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**:658–671.
- To JPC, Deruère J, Maxwell BB, et al (2007) Cytokinin Regulates Type-A *Arabidopsis* Response Regulator Activity and Protein Stability via Two-Component Phosphorelay. *The Plant Cell* **19**:3901–3914. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052662>
- Tokunaga H, Kojima M, Kuroha T, et al (2012) *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J* **69**:355–365.
- Tran L-SP, Urao T, Qin F, et al (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**:20623–20628.
- Turner JE, Mok DWS, Mok MC, Shaw G (1987) Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:3714–3717.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, et al (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**:1596–1604.
- Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **42**:231–235.
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, et al (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**:1743–1754.

- Vadassery J, Ritter C, Venus Y, et al (2008) The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**:1371–1383.
- Vandenbussche F, Habricot Y, Condiff AS, et al (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **49**:428–441.
- Veach YK, Martin RC, Mok DWS, et al (2003) O-glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiol* **131**:1374–1380.
- von Schwartzberg K, Kruse S, Reski R, et al (1998) Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *Plant J* **13**:249–257
- Von Wagner H, Michael G (1971) Der Einfluß unterschiedlicher Stickstoffversorgung auf die Cytokininbildung in Wurzeln von Sonnenblumenpflanzen. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **162**:147–158.
- Vrabka J, Niehaus E-M, Münsterkötter M, et al (2019) Production and role of hormones during interaction of *Fusarium* species with maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Front Plant Sci* **9**: 1936. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01936>
- Vreman HJ, Thomas R, Corse J, et al (1978) Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia oleracea* L. leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol* **61**:296–306
- Vyroubalová Š, Václavíková K, Turečková V, et al (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol* **151**:433–447.
- Wang J, Ma X-M, Kojima M, et al (2011) N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **52**:2200–2213.
- Wang C, Sang J, Wang J, et al (2013a) Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. *PLOS Biology* **11**:e1001493. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001493>
- Wang J, Ma X-M, Kojima M, et al (2013b) Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **65**:9–16.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* **46**:W296–W303.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:10487–10492.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, et al (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**:2532–2550.
- Werner T, Holst K, Pörs Y, et al (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *J Exp Bot* **59**:2659–2672.
- Werner T, Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **12**:527–538.
- West AH, Stock AM (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochem Sci* **26**:369–376.
- Whitty CD, Hall RH (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can J Biochem* **52**:789–799.
- Wormit A, Traub M, Flörchinger M, et al (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochem J* **383**:19–26.
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, et al (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* **156**:1808–1818.
- Xie W, Zhou C, Huang RH (2007) Structure of tRNA dimethylallyltransferase: RNA modification through a channel. *J Mol Biol* **367**:872–881.
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, et al (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* **42**:1017–1023
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, et al (2005) *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* **15**:1566–1571.
- Yang X, Kalluri UC, Jawdy S, et al (2008) The F-box gene family is expanded in herbaceous annual plants relative to woody perennial plants. *Plant Physiol* **148**:1189–1200.

- Yeh K-C, Lagarias JC (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:13976–1398.
- Yokoyama A, Yamashino T, Amano Y-I, et al (2007) Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **48**:84–96.
- Yonekura-Sakakibara K, Kojima M, Yamaya T, Sakakibara H (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. *Plant Physiol* **134**:1654–1661.
- Zalabák D, Galuszka P, Mrízová K, et al (2014) Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiol Bioch* **74**:283–293.
- Zhang K, Letham DS, John PCL (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200**:2–12.
- Zhang K, Novak O, Wei Z, et al (2014) *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat Commun* **5**:3274. <https://doi.org/10.1038/ncomms4274>
- Zhou C, Huang RH (2008) Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:16142–16147.
- Žižková E, Dobrev PI, Muhovski Y, et al (2015) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) SIPT3 and SIPT4 isopentenyltransferases mediate salt stress response in tomato. *BMC Plant Biology* **15**:85. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0415-7>
- Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H (2016) Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *J Mol Biol* **428**:3752–3775.
- Zubo YO, Blakley IC, Yamburenko MV, et al (2017) Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**:E5995–E6004.
- Zürcher E, Liu J, Donato M di, et al (2016) Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science* **353**:1027–1030.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

At	Arabidopsis thaliana
BAP	benzyladenin (benzylaminopurin)
CKX	cytokinindehydrogenasa
cZ(R)	cis-zeatin(ribosid)
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
ENT	ekvilibrativní nukleosidový transportér
GFP	zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“)
HK	histidinkinasa
HI	Humulus lupulus
HMBPP	4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát
HPt	fosfotransferový protein
iP(R)	isopentenyladenin(ribosid)
IPT	isopentenyltransferasa
IPTG	isopropyl- $\beta$ thiogalaktopyranosid
LOG	cytokininribosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa („Lonely guy“)
MEP	methylerythritolfosfátová dráha
MES	2 (N morfolino)ethanesulfonová kyselina
MOPS	3-(N-morfolino)propanesulfonová kyselina
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
MVA	mevalonátová dráha
NBD	7-nitrobenzofurazan
NBT/BCIP	nitrotetrazoliová modř / 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
NRH	nukleosid- <i>N</i> -ribohydrolasa
<i>oT</i> (R)	<i>ortho</i> -topolin(ribosid)
Pc	Populus $\times$ canadensis (cv. Robusta)
PUP	purinová permeasa
PVDF	polyvinylidendifluorid
RR	regulátor odpovědi („response regulator“)
TCS	systém dvou komponent („two-component system“)
TDZ	thidiazuron
tZ(R)	trans-zeatin(ribosid)
VÚLHM	Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti
WT	rostlina divokého typu („wild type“)

## 11 PŘÍLOHY

### ***Příloha 1 – prvoautorská publikace***

Jaworek P, Kopečný D, Zalabák D, Šebela M, Kouřil Š, Hluska T, Končítíková R, Podlešáková K, Tarkowski P (2019) Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta* 250:229–244.

### ***Příloha 2 – manuskript prvoautorské publikace a doplňující materiály***

Jaworek P, Tarkowski P, Hluska T, Kouřil Š, Nisler J, Kopečný D (2019) Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins. *Planta*, přijato k publikování dne 13.10.2019



# Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar

Pavel Jaworek<sup>1,2</sup> · David Kopečný<sup>2</sup> · David Zalabák<sup>3</sup> · Marek Šebela<sup>2</sup> · Štěpán Kouřil<sup>1</sup> · Tomáš Hluska<sup>5</sup> · Radka Končítíková<sup>2</sup> · Kateřina Podlešáková<sup>4</sup> · Petr Tarkowski<sup>1,5</sup> 

Received: 11 December 2018 / Accepted: 25 March 2019 / Published online: 12 April 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

## Abstract

**Main conclusion** Isoprenoid and aromatic cytokinins occur in poplar as free compounds and constituents of tRNA, poplar isopentenyltransferases are involved in the production of isoprenoid cytokinins, while biosynthesis of their aromatic counterparts remains unsolved.

Cytokinins are phytohormones with a fundamental role in the regulation of plant growth and development. They occur naturally either as isoprenoid or aromatic derivatives, but the latter are quite rare and less studied. Here, the spatial expression of all nine isopentenyl transferase genes of *Populus × canadensis* cv. *Robusta* (*PcIPTs*) as analyzed by RT-qPCR revealed a tissue preference and strong differences in expression levels for the different adenylate and tRNA *PcIPTs*. Together with their phylogeny, this result suggests a functional diversification for the different *PcIPT* proteins. Additionally, the majority of *PcIPT* genes were cloned and expressed in *Arabidopsis thaliana* under an inducible promoter. The cytokinin levels measured in the *Arabidopsis*-overexpressing lines as well as their phenotype indicate that the studied adenylate and tRNA *PcIPT* proteins are functional in vivo and thus will contribute to the cytokinin pool in poplar. We screened the cytokinin content in leaves of 12 *Populus* species by ultra-high performance-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and discovered that the capacity to produce not only isoprenoid, but also aromatic cytokinins is widespread amongst the *Populus* accessions studied. Important for future studies is that the levels of aromatic cytokinins transiently increase after daybreak and are much higher in older plants.

**Keywords** Cytokinin · Expression · Isopentenyltransferase · Poplar · Topolin · tRNA

---

Pavel Jaworek and David Kopečný contributed equally.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03152-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Petr Tarkowski  
petr.tarkowski@upol.cz

- <sup>1</sup> Department of Phytochemistry, Faculty of Science, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic
- <sup>2</sup> Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Faculty of Science, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic
- <sup>3</sup> Department of Molecular Biology, Faculty of Science, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

## Abbreviations

BA	<i>N</i> <sup>6</sup> -Benzyladenine
<i>c, m, o, t</i>	<i>cis</i> -, <i>meta</i> -, <i>ortho</i> -, <i>trans</i> -
DMAPP	Dimethylallyl diphosphate
HI	<i>Humulus lupulus</i>

- <sup>4</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic
- <sup>5</sup> Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Crop Research Institute, Šlechtitelů 29, 78371 Olomouc, Czech Republic

iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -(2-Isopentenyl)adenine
iPR	<i>N</i> <sup>6</sup> -(2-Isopentenyl)adenine riboside
IPT	Isopentenyl transferase
Pc	<i>Populus × canadensis</i> cv. <i>Robusta</i>
RMP	Riboside 5'-monophosphate
T	Topolin
TR	Topolin riboside
Z	Zeatin
ZR	Zeatin riboside

## Introduction

Cytokinins are plant hormones that control a wide variety of growth and developmental processes. Among other functions, they induce cell division together with auxins (Skoog and Miller 1957), regulate morphogenesis (Werner et al. 2001) and cambial development (Nieminen et al. 2008), modulate activity of root, shoot and reproductive meristems (Werner et al. 2001; Bartrina et al. 2011), and inhibit leaf senescence (Gan and Amasino 1995). Cytokinins additionally mediate responses to environmental stimuli, including light conditions, drought and osmotic stress, availability of some mineral nutrients, and interaction with pathogenic or symbiotic microorganisms (Werner and Schmülling 2009). All the above effects are mediated via histidine kinase signaling pathways (Suzuki et al. 2001). Interestingly, cytokinins also occur in bacteria, fungi, worms, parasites, and insects (Stirk and Staden 2010; Giron et al. 2013; Samanovic et al. 2015; Andrabi et al. 2018; Smant et al. 2018) and thus represent ancient signals that can function across kingdom borders (Schultz 2002; Schultz and Appel 2004). For instance, they are present in gall-forming insect secretions (Elzen 1983) and are produced by plant pathogenic bacteria (e.g., *Rhodococcus fascians*; Stes et al. 2011) as well as fungi (e.g., *Fusarium* species; Vrabka et al. 2019) where they play a relevant role in pathogenicity by modulating the cytokinin homeostasis of the host plant (Kabbara et al. 2018; Spallek et al. 2018). In addition, cytokinins have been detected outside living cells in leaf litter and soil, fresh and marine water (Stirk and Staden 2010). It is not clear, whether these are breakdown products or secreted compounds fulfilling a signaling role in the ecosystem (Robischon 2015).

Cytokinins are *N*<sup>6</sup>-substituted adenine derivatives (bases, ribosides or nucleosides) with either an isoprenoid or an aromatic side chain. Isoprenoid cytokinins, comprising *N*<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenine (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*) and dihydrozeatin are ubiquitous in plants (Gajdošová et al. 2011), but they are also produced by algae, bacteria and some insects and nematodes (Stirk and Staden 2010). Moreover, bacteria and eukaryotes carry isoprenoid cytokinins as modified adenosines at position 37 in a subset of tRNAs of which the anticodon sequence

starts with U. This modification is adjacent to the anticodon region and stabilizes the anticodon–codon interaction with mRNA (Persson et al. 1994). In contrast, the occurrence of aromatic cytokinins, such as *N*<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) and its hydroxy derivatives *ortho*- and *meta*-topolin (*oT* and *mT*), is limited to few plant species including calla, palm, and red goosefoot, but they are best studied in poplar species (Strnad et al. 1997; Chaves Das Neves and Pais 1980; Jones et al. 1996; Doležal et al. 2002; Edlund et al. 2017).

The key step in the biosynthesis of isoprenoid cytokinins is the transfer of dimethylallyl diphosphate (DMAPP) or (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl diphosphate (HMBPP) (Krall et al. 2002) to the exocyclic amino group of either free or tRNA-bound adenosine phosphate. The reaction is catalyzed by two related dimethylallyl transferases, commonly referred to as isopentenyl transferases (IPTs). Plant adenylate IPTs (EC 2.5.1.27) utilize ADP or ATP as a substrate (Kakimoto 2001) and produce mainly iP-type cytokinins, which can further be hydroxylated by cytochrome P450 monooxygenases to *tZ*-type structures (Takei et al. 2004). tRNA IPTs (EC 2.5.1.75) are responsible for tRNA modification, the degradation of which is the main source of *cZ*-type cytokinins, at least in *Arabidopsis thaliana* (Miyawaki et al. 2006). The crystal structure of the adenylate IPT from *Humulus lupulus* has been solved (Chu et al. 2010), as well as that of the tRNA IPTs from *Saccharomyces cerevisiae* (Zhou and Huang 2008), *Escherichia coli* (Seif and Hallberg 2009), *Bacillus halodurans* (PDB IDs: 2QGN, 3EXA) and *Staphylococcus epidermidis* (PDB ID: 3D3Q). Cytokinins are synthesized as inactive nucleotides that are activated by a phosphoribohydrolase called ‘Lonely guy’ to the free bases (Kurakawa et al. 2007). The conversion from nucleosides to bases on the other hand is catalyzed by nucleosidases (Kopečná et al. 2013). The cytokinin pool is controlled by the combination of biosynthesis, activation, interconversion to inactive forms, and irreversible oxidation by cytokinin oxidase/dehydrogenases (Houba-Hérin et al. 1999; Morris et al. 1999).

Although much is known about the metabolism of isoprenoid cytokinins (Frébort et al. 2011), the origin and fate of aromatic cytokinins remain unexplained. In that context, *Populus × canadensis* cv. *Robusta* can be considered as a model organism as it has traditionally been used for studies on aromatic cytokinins. Indeed, *oT* (Strnad et al. 1992), *oT* riboside (*oTR*) (Horgan et al. 1973; Hewett and Wareing 1973), *oT*-9-glucoside (Strnad et al. 1994), and *mT* and its sugar conjugates (Strnad et al. 1997) have been identified for the first time as naturally occurring compounds in extracts of *P. × canadensis* leaves. *P. × canadensis* is a hybrid cross of *Populus deltoides* and *Populus nigra* and all existing *P. × canadensis* cv. *Robusta* specimens are clones of the original staminate tree.

In this work, we wanted to better understand cytokinin production in poplar. For the isoprenoid cytokinins, we cloned the nine *IPTs* from *P. × canadensis*, determined their expression in different poplar tissues by RT-qPCR, and analyzed their phylogeny. Additionally, to demonstrate their functionality, six out of nine *IPT* genes were expressed in *A. thaliana* for protein production and phenotyping, and their active site composition was examined. Finally, as an essential step towards the identification of the genetic determinants implicated in aromatic cytokinins biosynthesis, we profiled the cytokinin content of various poplar accessions and species to get insight into the occurrence of aromatic cytokinins and the timing of their synthesis.

## Material and methods

### Biological material and growth conditions

Depending on the analysis, different types of samples were collected. For the cytokinin analyzes, fully developed leaves of the 12 poplar species were randomly harvested from the lower part of the canopy of field-grown young suckers 4 h after daybreak at the research station of the Forestry and Game Management Research Institute (FGMRI; Kunovice, CZ; 49°2'37"N, 17°25'27"E). Additionally, leaves of mature *Populus deltoides* and *Populus nigra* trees were used to assess the influence of age on cytokinin levels. For the RT-qPCR experiments, samples of *Populus × canadensis* cv. *Robusta* leaves, flowers and shoot meristems were collected from trees growing in an urban environment (Olomouc, CZ, 49°35'44"N, 17°25'27"E) and roots were collected from twigs rooted in tap water for two weeks. Calli of *P. × canadensis* were derived from dormant leaf buds provided by Dr. Jana Malá (FGMRI, Jíloviště, CZ). The calli was grown in a growth chamber at 23/21 °C (day/night), with a 14-h photoperiod (140 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) on MS2 medium with vitamins (Duchefa), pH 5.7, solidified by 0.7% (w/v) plant agar (Duchefa) and supplemented with 2% (w/v) sucrose, 10 mg L<sup>-1</sup> glutamine, 2 mg L<sup>-1</sup> glycine (Appli-Chem, Darmstadt, Germany), 0.2 mg L<sup>-1</sup> tZ and 1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Duchefa). A subcultivation was performed every 2 weeks.

The seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. accession Col-0, both wild-type and *atipt2* 9 double knockout mutants (kindly provided by Tatsuo Kakimoto, Osaka University, Japan), were surface-sterilized with 70% (v/v) ethanol and 10% (w/v) sodium hypochlorite. They were germinated in Petri dishes on MS2 medium, supplemented with 25 mg L<sup>-1</sup> hygromycin B (Sigma-Aldrich) for homozygote selection of the latter. The germination was synchronized by a 2-day incubation at 4°C and the plates were then transferred to a

growth chamber set to 23/21°C (day/night) at a 16-h photoperiod (140 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Phenotyping of *Arabidopsis* wild-type, mutant, and transgenic lines was performed under the same growth conditions. Seeds were germinated on vertically oriented plates on MS2 medium with or without 5 μM 17-β-estradiol (Sigma-Aldrich) and the primary root length and the overall morphology of the plants were recorded 12 days later.

### Cloning and expression analysis of poplar *IPTs*

The gene-specific primers used for PCR amplification of the nine *P. × canadensis* genes, abbreviated as *PcIPTs*, are provided in Table S1. Total RNA was extracted from the different plant tissues using the RNAqueous isolation kit (Thermo Fisher Scientific) and treated with Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized by ProtoScript II reverse transcriptase (NEB) and used for PCR amplification by Q5 DNA polymerase (NEB). Only *PcIPT7a* and *PcIPT7b*, which carry an intron, were cloned directly from genomic DNA purified by DNeasy Plant kit (Qiagen). Their introns were removed by PCR and the plasmid constructs were religated. All *IPT* sequences were cloned in a Zero Blunt vector (Thermo Fisher Scientific), transformed into NEB 5-alpha competent *E. coli* cells and sequenced.

For the expression analysis, cDNAs from the different plant tissues and calli of *P. × canadensis* were synthesized by RevertAid H Minus reverse transcriptase using random hexamer primers (Thermo Fisher Scientific). RNA from two biological replicates was transcribed in two independent reactions. The subsequent RT-qPCR analysis of each cDNA was performed in triplicate on a QuantStudio 5 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific). The reaction mixture contained 250 nM TaqMan 6-FAM TAMRA probe, 300 nM of both primers, ROX Reference Dye (Thermo Fisher Scientific), and MyTaq Mix (Bioline, London, UK). The primers and TaqMan probes (Table S2) were designed using Primer Express 3.0 software (Thermo Fisher Scientific). Plasmid constructs carrying the ORFs of the *PcIPT* genes were used as templates for the determination of PCR efficiencies of the designed probes and primer pairs as well as to verify their specificity. Cycle threshold values were normalized with respect to the amplification efficiency and two housekeeping genes, poplar ubiquitin extension protein 1 (*UBQ1*, Gene Bank XP\_002318470) and α-tubulin 2 (*TUA2*, XP\_002303998) which were cloned from *P. × canadensis* and sequenced.

### Phylogenetic analysis of adenylate *IPTs*

The amino acid alignment of the adenylate *IPT* sequences was performed with T-Coffee (Notredame et al. 2000), treated with Gblocks (Castresana 2000) and then a maximum



likelihood phylogeny plus bootstrap analysis was done with PhyML v3.0 using the LG amino acid replacement matrix (Guindon et al. 2010). The following unpublished sequences (provided with their abbreviations and Phytozome ID numbers) were retrieved by a BLAST search from Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>): *Spirodela polyrrhiza* (SpipoIPT1: Spipo12G0008100), *Aquilegia coerulea* (AcIPT1: Aqcoe3G036000.1, AcIPT3: Aqcoe2G331600.1), *Amaranthus hypochondriacus* (AhIPT3: AHYPO\_002878-RA, AhIPT5a: AHYPO\_003836-RA, AhIPT5b: AHYPO\_007916-RA, AhIPT5c: AHYPO\_019779-RA), *Kalanchoe laxiflora* (KIIP1a: Kalax.0037s0153.1, KIIP1b: Kalax.0509s0007.1, KIIP1c: Kalax.0101s0038.1, KIIP1d: Kalax.0124s0069.1, KIIP1e: Kalax.0216s0012.1, KIIP1f: Kalax.0543s0031.1, KIIP3: Kalax.0039s0028.1, KIIP4: Kalax.0038s0074.1, KIIP5a: Kalax.0111s0027.1, KIIP5b: Kalax.0313s0034.1), *Eucalyptus grandis* (EgIPT3: Eucgr.K03385.1, EgIPT5a: Eucgr.B01146.1, EgIPT5b: Eucgr.H03602.1, EgIPT7: Eucgr.G00473.1), *Manihot esculenta* (MeIPT3a: Manes.01G209100.1, MeIPT3b: Manes.05G074300.1, MeIPT5a: Manes.03G185000.1, MeIPT5b: Manes.15G022800.1, MeIPT6a: Manes.06G067100.1, MeIPT6b: Manes.14G103300.1, MeIPT7: Manes.15G148500.1), *Ricinus communis* (RcIPT3: 28153.m000272, RcIPT5: 29844.m003302, RcIPT6: 30066.m000705, RcIPT7a: 29851.m002452, RcIPT7b: 29851.t000086), *Salix purpurea* (SpIPT3: SapurV1A.0053s0620.1, SpIPT5a: SapurV1A.0022s0170.1, SpIPT5b: SapurV1A.0656s0190.1, SpIPT6a: SapurV1A.0079s0060.1, SpIPT6b: SapurV1A.0078s0330.1, SpIPT7: SapurV1A.0576s0130.1), *Citrus sinensis* (CsIPT3: orange1.1g020775m, CsIPT5: orange1.1g020362m, CsIPT7: orange1.1g044048m), *Gossypium raimondii* (GrIPT3a: Gorai.004G082600.1, GrIPT3b: Gorai.007G135400.1, GrIPT3c: Gorai.007G147200.1, GrIPT5: Gorai.011G169700.1, GrIPT6a: Gorai.009G347400.1, GrIPT6b: Gorai.012G122700.1, GrIPT7: Gorai.004G259100.1), and *Brassica rapa* (BrIPT3a: Brara.I04365.1, BrIPT3b: Brara.D00029.1, BrIPT5a: Brara.J01679.1, BrIPT5b: Brara.B00796.1). Only a portion of all IPT sequences from *A. hypochondriacus*, *E. grandis*, *C. sinensis* and *B. rapa* was used to refine the tree without increasing its complexity too much.

The published IPT sequences comprise those from *Oryza sativa* (OsIPTs; Sakamoto et al. 2006), *Zea mays* (ZmIPTs; Brugière et al. 2008; Vyroubalová et al. 2009), *Solanum lycopersicum* (SlIPTs; Matsuo et al. 2012), *Vitis vinifera* (VvIPTs; Frébortová et al. 2015) with one extra sequence retrieved from Phytozome (VvIPT6b: GSVIVT01011107001), *Populus × canadensis* (PcIPTs), *A. thaliana* (AtIPTs; Kakimoto 2001; Takei et al. 2001), and *Prunus persica* (PpIPTs; Immanen et al. 2013). The IPT sequence of *Humulus lupulus* was retrieved from UniProt

(<https://www.uniprot.org/>) (HIIPT: Q5GHF7) (Chu et al. 2010).

### Inducible expression of poplar *IPTs* in *Arabidopsis thaliana*

The ORFs of *PcIPTs* were PCR amplified from the Zero Blunt constructs, fused with a C-terminal Myc tag (contained within the primer sequences; Table S1) and cloned into the cloning vector pENTR2B (Thermo Fisher Scientific). Because the protein sequence of PtIPT3 carries a putative farnesylation motif at the C-terminus, the Myc tag was fused with the protein N-terminus in this case. The ORFs were then subcloned under control of an estradiol-inducible promoter in the binary vector pMDC7 (Curtis and Grossniklaus 2003) using Gateway LR cloning. The final *pMDC7::PcIPT* constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 and infiltrated into *A. thaliana* using the floral-dip method. The constructs for tRNA *PcIPT2* and 9, were introduced into the *atipt2 9* double knockout, while the adenylate *PcIPTs* were transformed into the wild-type *A. thaliana* Col-0 background. T1 seedlings were selected on hygromycin B (Sigma-Aldrich) and the presence of the transgenic cassette was confirmed by PCR. In the next generations, single transgene insertion lines (75% survival ratio) and subsequently homozygous lines (100% survival ratio) were selected on hygromycin B and further used. Three-week-old seedlings grown on MS2 medium with vitamins (Duchefa) at pH 5.7 solidified by 0.7% plant agar (Duchefa) and supplemented with 2% sucrose were sprayed with 5 µM 17-β-estradiol (Sigma-Aldrich) in 0.1% Tween 20. After 24 h of induction, entire seedlings were snap frozen in liquid nitrogen and stored at – 80 °C. For RT-qPCR experiments, RNA was extracted from each homozygous line (3–4 plants per *IPT* construct). The protein expression was verified by Western blot analysis (see Supplemental Material and methods). The membrane was incubated with an anti-Myc tag antibody, clone 4A6 (diluted 5000 ×; Merck; Cat. # 05–724) for 1 h and probed using the goat anti-mouse IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate (diluted 10,000 ×; Thermo Fisher Scientific; Cat. # A16069).

### Accession numbers

The *IPT* sequences from *P. × canadensis* were submitted to GenBank under the accession numbers KU319560 (*PcIPT2*), KU319561 (*PcIPT9*), KU319566 (*PcIPT3*), KU319564 (*PcIPT5a*), KU319565 (*PcIPT5b*), KU319562 (*PcIPT6a*), and KU319563 (*PcIPT6b*). Sequences of *PcIPT7a* and *PcIPT7b* were not submitted because they were not cloned from cDNA.

### Cytokinin purification and analysis

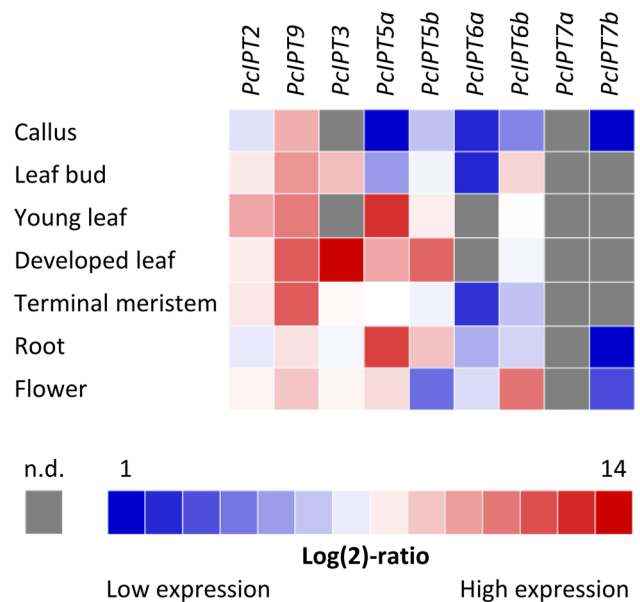
Free cytokinins were isolated and purified as outlined by Bar et al. (2016). Briefly, plant tissue (100 mg) was homogenized in 1 mL ice-cold Bielecki solution (methanol–chloroform–formic acid–water; 12:5:1:2) and after 12 h of extraction in the presence of 3 pmol of heavy-labeled standards (<sup>2</sup>H<sub>7</sub>-N<sup>6</sup>-BA, <sup>2</sup>H<sub>7</sub>-N<sup>6</sup>-BAR, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-MemT, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-mT <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-m-T9G, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-mTR, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-oT <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-oT9G, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-oTR, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-pT <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-pT9G, <sup>15</sup>N<sub>4</sub>-pTR, <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-tZ, <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-cZ <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-DHZ, <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-iP, <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-iPRMP, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-tZRMP, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-cZRMP <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-DHZRMP, <sup>2</sup>H<sub>7</sub>-N<sup>6</sup>-BARMP, <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-iPR, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-tZR, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-cZR <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-DHZR, <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-iPRMP, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-tZ9G, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-cZ9G <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-DHZ9G, <sup>2</sup>H<sub>7</sub>-N<sup>6</sup>-BAR9G) (OIChemIm, Olomouc, CZ), cytokinins were isolated by solid-phase extraction (SPE) with a strong cation exchanger (Agilent Technologies). Eluates were concentrated in vacuo at 37 °C. Cytokinins were analyzed via UHPLC-MS/MS (LCMS-8050, Shimadzu) according to Novák et al. (2008). Data were processed by the standard isotope dilution method (Rittenberg and Foster 1940).

tRNA-bound cytokinins were isolated as outlined by Frébortová et al. (2017). Briefly, tRNA was isolated from 100 mg of frozen plant tissue, hydrolyzed with 2 M KOH, and dephosphorylated using FastAP alkaline phosphatase (Thermo Fisher Scientific). After dephosphorylation, heavy-labeled cytokinin standards were added and the cytokinins were isolated by SPE with C18 cartridge (Agilent Technologies). Eluates were concentrated in vacuo at 37 °C and analyzed via UHPLC-MS/MS. All cytokinin quantitations were carried out in three technical replicates.

### Results

#### Cloning and expression profile of the IPT genes in *Populus × canadensis* cv. *Robusta*

To explore isoprenoid cytokinin biosynthesis in poplar, we first set out to clone the nine *IPT* genes of *P. × canadensis* (indicated as *PcIPT*; Table 1), whereas seven *PcIPTs* were successfully cloned from cDNA, *PcIPT7a* and *PcIPT7b* which contain an intron, had to be cloned from genomic



**Fig. 1** Expression profiles of the nine *IPT* genes of *P. × canadensis* in various organs and tissues. The heat map represents transcript levels detected in 1 ng of total RNA given as a color-coded scale of the log<sub>2</sub>-ratios from the lowest (blue) to the highest (red) values; the gray color indicates that the expression of the respective gene was not detected

**Table 1** Nomenclature of *P. × canadensis* *IPT* genes

Gene name	GenBank accession	Phytozome ID <i>P. trichocarpa</i>	Chromosome #	Number of exons	Number of amino acids
<i>PcIPT2</i>	KU319560	Potri.009G147600	9	10	495
<i>PcIPT9</i>	KU319561	Potri.001G376600	1	11	445
<i>PcIPT3</i>	KU319566	Potri.014G139300	14	1	326
<i>PcIPT5a</i>	KU319564	Potri.008G202200	8	1	328
<i>PcIPT5b</i>	KU319565	Potri.010G030500	10	1	327
<i>PcIPT6a</i>	KU319562	Potri.008G121500	8	1	360
<i>PcIPT6b</i>	KU319563	Potri.010G123900	10	1	368
<i>PcIPT7a</i>	N/A	Potri.004G150900	4	2	333
<i>PcIPT7b</i>	N/A	Potri.008G033300	8	2	335

The table includes GenBank accession numbers and Phytozome ID numbers for the respective *P. trichocarpa* orthologs with their chromosome location and exon numbers

DNA and the introns were removed by PCR. Then, based on the obtained *PcIPT* sequences, primers and probes were designed to determine the expression level of the nine *IPT* genes in different tissues and organs of *P. × canadensis* using RT-qPCR (Fig. 1; Table S3).

Of all *PcIPT* genes, the tRNA *PcIPT9* was the most abundantly expressed in all tested tissues and organs, while the second tRNA *PcIPT2* was much less abundant (Fig. 1). With the exception of *PcIPT9*, all other *PcIPTs* were down-regulated in callus cultured on medium supplemented with the *tZ*. Transcripts of *PcIPT3* were highly abundant in fully developed leaves and leaf buds, whereas the expression of the two paralogs *PcIPT5a* and *PcIPT5b* was high in both young and developed leaves and also in roots. *PcIPT6b* was highly expressed in flowers and leaf buds, while its paralog *PcIPT6a* was only weakly or not expressed in most samples. Expression of *PcIPT7a* and *PcIPT7b* was the lowest of all *PcIPTs*. *PcIPT7a* was not expressed at all while only few gene copies of *PcIPT7b* were detected in flowers, roots and calli.

### Phylogenetic analysis and active site comparison of the IPT sequences of *P. × canadensis*

To examine their evolutionary relationship, a comprehensive phylogenetic analysis was performed of the adenylate IPT sequences from *P. × canadensis* and 17 other plant species (Fig. 2). There was a minor difference between the IPT sequences from *P. × canadensis* obtained in this work, and those from *P. deltoides* (genome pre-release v2.1) and *P. trichocarpa* (genome release v3.0; Tuskan et al. 2006) (Table S4), but this was without consequences for the amino acid composition of their active sites (data not shown). For the *PcIPT7* genes two peculiarities were noted. First of all, the *IPT7* genes found in poplar, *Manihot esculenta*, *Prunus persica* and *Ricinus communis* contained an intron, which is highly uncommon among adenylate *IPTs*. Second, in the phylogenetic tree, the *PcIPT7*-containing clade did not cluster together with other dicot *IPTs*, but exhibited the closest relationship with one of the two subgroups of monocot *IPTs*. *PcIPT3* was the only *PcIPT* that contained a C-terminal CLVA motif recognized by plant farnesyl transferases (Galichet et al. 2008). This motif was missing in the remaining *IPTs* from the *IPT3* clade, except for the related *IPT3* from *Salix purpurea* and that of *A. thaliana*. The clade containing both *PcIPT5* proteins also comprised *AtIPT5* and *AtIPT7*, while *PcIPT6* paralogues clustered together with four *IPTs* from *A. thaliana*, namely *AtIPT1*, *AtIPT4*, *AtIPT6* and *AtIPT8*. The *PcIPT6* clade also comprised *HIIPT* from hops (*Humulus lupulus*) for which the crystal structure is known, allowing a more detailed analysis (Chu et al. 2010). Both *PcIPT6* proteins displayed ~60% identity and ~80%

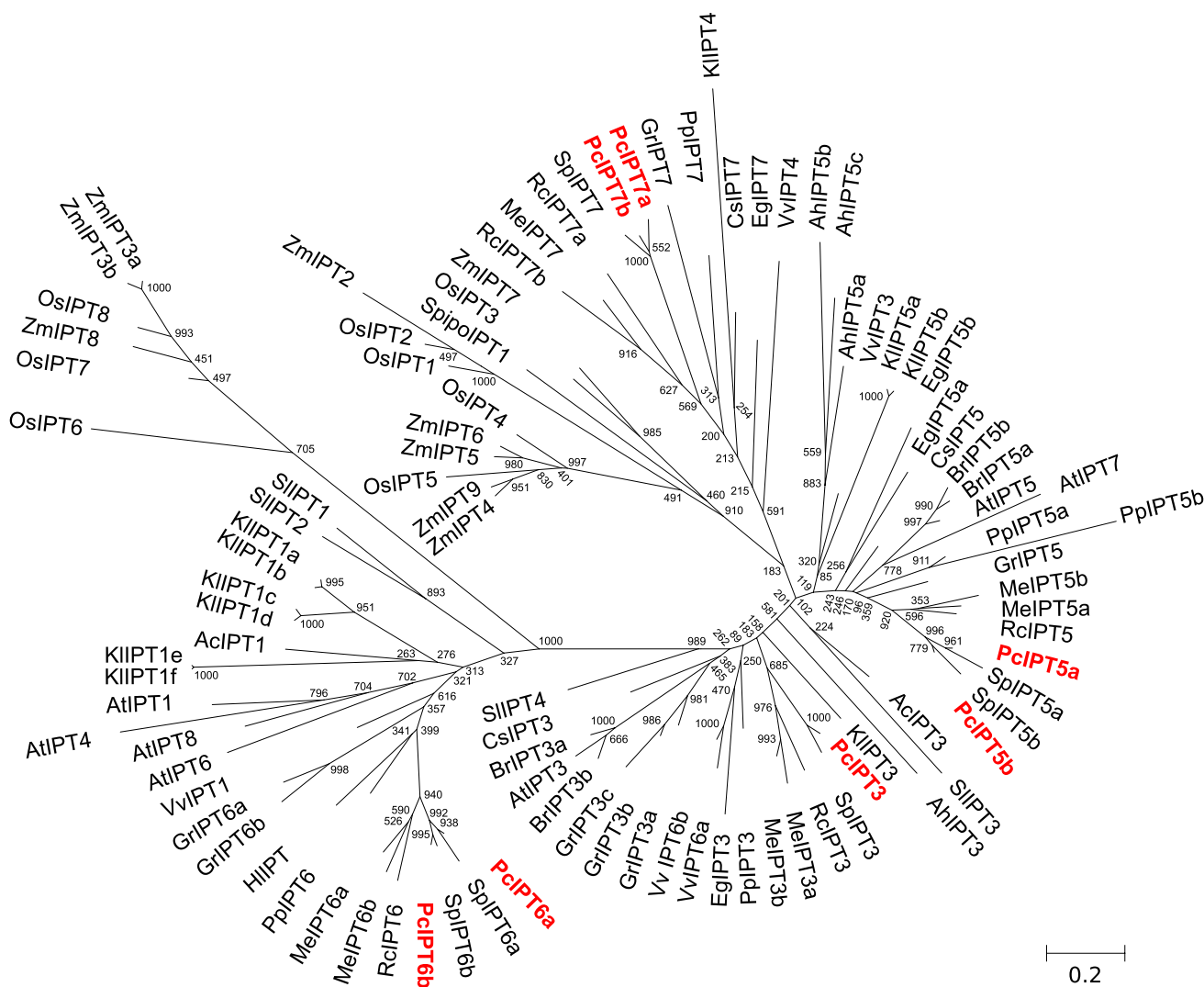
similarity to *HIIPT*. The similarities of remaining *PcIPTs* are shown in Table S5.

The active sites of the *P. × canadensis* *IPTs* were modeled by the Swiss-model program (Waterhouse et al. 2018) using the crystal structure of *HIIPT* as a template (PDB ID: 3A8T). From the sequence alignment it was clear that the active site residues were highly conserved among the eight adenylate *IPTs*, whereas the two tRNA *IPTs* displayed numerous substitutions at both the DMAPP and ADP/ATP binding sites (Fig. 3a). To predict the impact of the few substitutions in the adenylate *PcIPTs* on their conformation and substrate interaction, their model was superposed on the *HIIPT* structure. Concerning the ADP/ATP binding site, the substitution of Lys220 to arginine, which occurred in all but the *PcIPT6* proteins, did not lead to a conformational change (Fig. 3b). Both *PcIPT7* proteins had two additional substitutions at the positions of Met64 (to Ile) and Ser131 (to Arg). While the first substitution, which also occurred in *PcIPT6b*, did not change the nonpolar character of the interaction with the adenine moiety of ADP/ATP, the second one, which was unique to *IPT7*, could positively affect the affinity for ADP/ATP via a salt-bridge interaction with the phosphate moiety (Fig. 3b). Comparison of the ADP/ATP binding sites of the 99 plant adenylate *IPTs* used for the phylogenetic analysis illustrated that the residues at positions 64, 131 and 220 were indeed less conserved for their interaction with ADP/ATP (Fig. 3c).

Because the DMAPP binding site was highly conserved, we deduced the putative binding of DMAPP in the *PcIPTs* by superposing the model of the tRNA *IPT* from *Saccharomyces* (PDB ID: 3EPL) with that of *HIIPT*. The second phosphate of the superposed DMAPP overlapped with the phosphate moiety that was co-crystallized within *HIIPT* structure. A comparison of the DMAPP binding sites showed that substitutions especially occurred at positions 40, 41 and 44 (Fig. 3c). As the second phosphate group of DMAPP establishes hydrogen bonds to the main chain nitrogen atoms of residues 40–44, the side chain variations should have minimal effects on DMAPP binding (Fig. 3d). The *PcIPT7* proteins had a substitution at Gly40 to Ala and both *PcIPT6* proteins had two substitutions, first at Thr41 to Cys and second at Ser44 to Thr (Fig. 3a). When the *HIIPT* crystal structure and the *PcIPT* structure models are considered, based on this analysis, it is unlikely that an aromatic substrate different from DMAPP would fit the active site cavity due to steric hindrance of Ile222. (Fig. 3d).

### Heterologous expression of *PcIPTs*

With the nine *PcIPT* genes cloned, we introduced them in an appropriate vector for protein production and purification in *E. coli* (see Supplemental Material and methods). Except for *PcIPT9*, protein bands with molecular

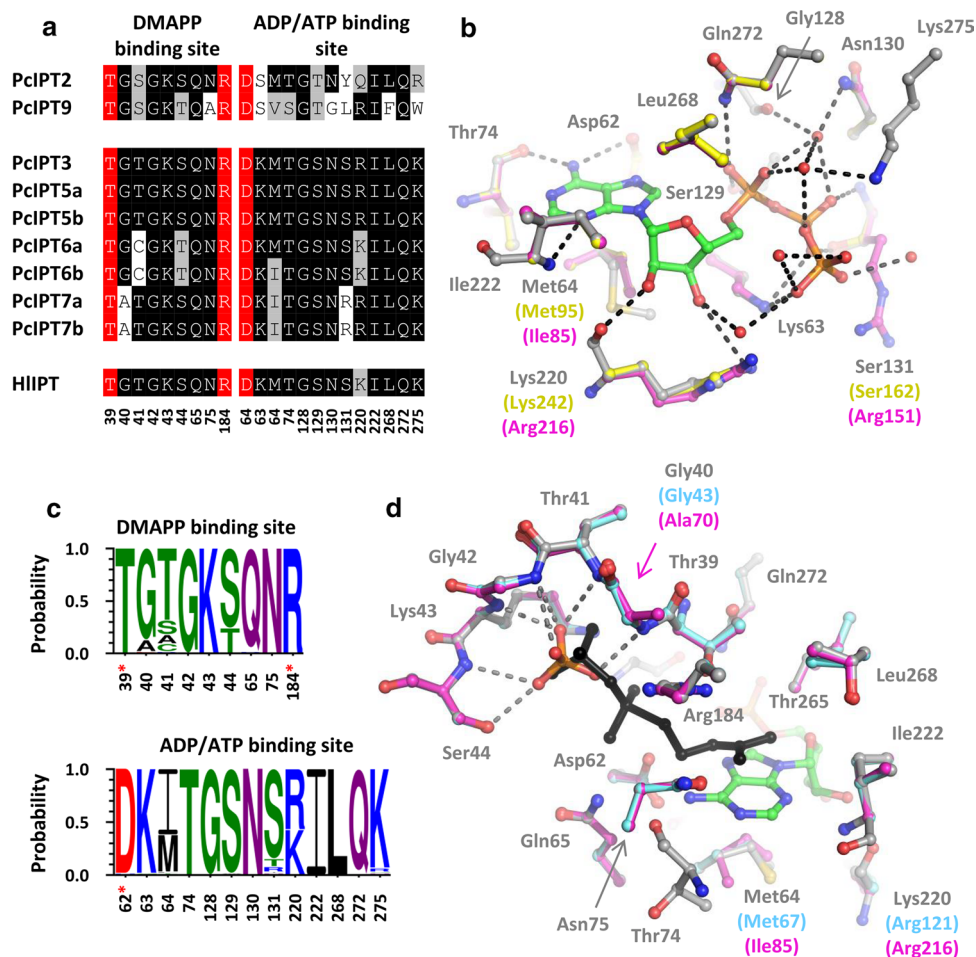


**Fig. 2** An unrooted maximum likelihood phylogenetic tree of 99 adenylate IPT amino acid sequences from 18 plant species. PcIPTs are highlighted in red and the internal labels give bootstrap frequencies for each clade. Plant species abbreviations are as follows: Ac=*Aquilegia coerulea*, Ah=*Amaranthus hypochondriacus*, At=*Arabidopsis thaliana*, Br=*Brassica rapa*, Cs=*Citrus sinensis*, Eg=*Euca-*

*lyptus grandis*, Gr=*Gossypium raimondii*, Hl=*Humulus lupulus*, Kl=*Kalanchoe laxiflora*, Me=*Manihot esculenta*, Os=*Oryza sativa*, Pp=*Prunus persica*, Rc=*Ricinus communis*, Sp=*Salix purpurea*, Sl=*Solanum lycopersicum*, Sp=*Spirodela polyrhiza*, Vv=*Vitis vinifera*, Zm=*Zea mays*

weight estimates corresponding to the respective IPTs were detected in crude extracts of the bacterial lysates (Fig. S1a). However, it was not possible to purify active IPTs from the soluble protein fraction or to resolubilize and refold the proteins from inclusion bodies. Solubilization of these inclusion bodies and subsequent Western blot analysis supported the expression of the genes (Fig. S1b) and the immuno-detected bands were in-gel digested and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (see Supplemental Material and methods), confirming their identity as the respective IPTs (Table S6). As none of the applied approaches led to functional proteins we were unable to analyze PcIPTs enzyme kinetics in vitro.

Despite this setback, to be able to explore the IPT activity of the adenylate PcIPTs after all, we continued to assess their in vivo functionality through overexpression in *A. thaliana* accession Col-0 under the estradiol-inducible promoter. Additionally, the two tRNA *PcIPTs* were transformed into the *atipt2* 9 double knockout mutant to verify functional complementation. New constructs were prepared for all *PcIPT* genes providing them with a C- or N-terminal Myc tag and these constructs were introduced into *Arabidopsis* via *Agrobacterium*-mediated floral-dip transformation. Although the procedure was not successful for *PcIPT2*, *PcIPT7a* and *PcIPT7b*, homozygous lines in the Col-0 background carrying a single transgenic insertion were obtained

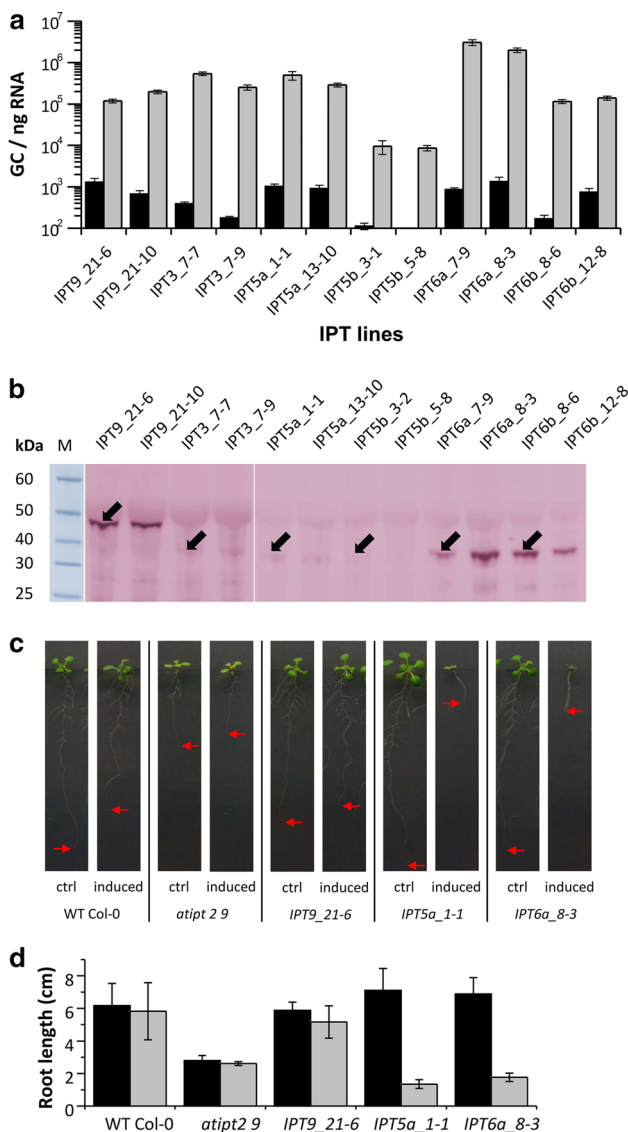


**Fig. 3** Analysis of the amino acid residues in the active sites of popular IPTs. **a** Alignment of the PciPTs with the HIPT sequence. Catalytic residues are highlighted in red. **b** Conservation of the ADP/ATP binding sites in models of PciPT6a and PciPT7b constructed by Swiss-model using the crystal structure of HIPT (PDB ID: 3A8T) as a template. Unconserved residues between IPTs are labeled using the structure colors. HIPT is colored in gray, IPT6a is yellow and IPT7b is purple. **c** Overall conservation of DMAPP and ATP binding sites in 99 plant adenylate IPTs. The Weblogo was generated from the

sequences used for the phylogenetic analysis. Catalytic residues are marked with asterisks. **d** Conservation of the DMAPP binding sites in models of PciPT5a (cyan) and PciPT7b (purple) constructed by Swiss-model using the crystal structure of HIPT (gray) as a template. The black colored DMAPP molecule is superposed from the *Saccharomyces* tRNA IPT structure (PDB ID: 3EPL), hydrogen bonds are shown only for the second phosphate as given in the HIPT structure. Numbering in all panels follows the sequence of HIPT

for *PcIPT3*, *PcIPT5a*, *PcIPT5b*, *PcIPT6a*, and *PcIPT6b* and in the mutant background for *PcIPT9*. Analysis of their transcript levels by RT-qPCR before and after induction showed that in nearly all lines a leaky expression occurred before induction, which was the highest for line *IPT3\_2-4* with  $1446 \pm 414$  gene copies per ng of RNA (Fig. 4a). Nevertheless, the expression of all *PcIPTs* could be strongly activated by a 24 h-treatment with 17- $\beta$ -estradiol with induction levels ranging from 90- to 3600-fold for the lines *PcIPT5b\_3-1* and *PcIPT6a\_7-9*, respectively. Western blot verification of the *PcIPT* gene translation into proteins indicated that, whereas *PcIPT9* and both *PcIPT6* paralogs were highly expressed, protein production of PciPT5a/b and PciPT3 was weak (Fig. 4b).

To assess their role in cytokinin production, the isoprenoid cytokinin content of the transgenic plants was analyzed before and after estradiol induction. We noted that estradiol treatment of both wild-type Col-0 plants and the *atipt2 9* double knockout mutant decreased the concentration of all free cytokinins (Table 2). As expected, of all transgenic lines, the lowest alteration in free cytokinin levels was recorded for the lines expressing the tRNA *PcIPT9*. In the *PcIPT3* transgenic lines, the low protein level (Fig. 4b) correlated well with the very mild increase in the cytokinin content. Similarly, the intermediate increase in cytokinin concentration in the *PcIPT5b* transformants (Table 2) was in line with their moderate *PcIPT5b* expression and low protein level (Fig. 4b). On the other hand, the estradiol-induced



**Fig. 4** Heterologous expression of *PcIPTs* in *A. thaliana*. **a** Number of gene copies (GC) per ng of total RNA determined by RT-qPCR (threshold set to 100) and represented in a log-10 scale before (black bars) and after (gray bars) a 24 h-induction with 5  $\mu$ M 17- $\beta$ -estradiol. The tRNA *PcIPT9* was introduced in the *atipt2 9* mutant background, whereas the adenylate *PcIPTs* were introduced in the wild-type Col-0 background. **b** Western blot analysis of IPT proteins visualized by the anti-Myc tag antibody and the reaction of conjugated alkaline phosphatase with NBT/BCIP. **c** Representative examples of control (WT Col-0, *atipt2 9*) and transgenic *PcIPT* plants grown in the absence (ctrl) or presence (induced) of 17- $\beta$ -estradiol in the cultivation medium. The pictures were taken 12 days after germination. Red arrows indicate the length of the primary roots. **d** Quantification of the primary roots lengths of the wild-type, mutant, and transgenic plants ( $n=6$  plants per line) grown in the absence (black bars) or presence (gray bars) of inducer

expression of *PcIPT5a*, *PcIPT6a*, and *PcIPT6b* caused a dramatic increase in the level of the cytokinin nucleotides iPR 5'-monophosphate (iPRMP) and *tZRMP*. Expectedly, as

a consequence of these high amounts of IPT primary products, highly elevated concentrations of the other cytokinin metabolites, in particular the ribosides and free bases, were found as well (Table 2). Although for *PcIPT6a\_7-9* and *PcIPT6a\_8-3* *tZ* levels of  $7.5 \pm 0.6$  and  $16.2 \pm 0.5$  pmol  $g^{-1}$  FW were recorded, respectively, in all other cases the free bases of the Z-type cytokinins were below the limit of quantification.

Because cytokinins in plants not only occur as free compounds, but are also a component of tRNA, we also determined the concentration of tRNA-bound cytokinins. While iPR and *cZR* were undetectable in the *atipt2 9* knockout mutant, wild-type *Arabidopsis* plants reached 1.2–2.0 pmol  $\mu g^{-1}$  tRNA-bound iPR and 9.6–11.2 pmol  $\mu g^{-1}$  tRNA-bound *cZR*. The transgenic *PcIPT9* lines contained 1.4–2.0 pmol  $\mu g^{-1}$  tRNA-bound iPR and 2.1–2.8 pmol  $\mu g^{-1}$  tRNA-bound *cZR*. The differences before and after estradiol induction were minor (and included in the mentioned concentration ranges).

We additionally analyzed the aromatic cytokinin content in all generated *PcIPT* transgenic *Arabidopsis* lines, but neither free nor tRNA-bound aromatic cytokinins were detected.

Finally, to evaluate the effect of the *PcIPT* transgenes on *Arabidopsis* growth and development, the transgenic lines with the most prominent transgene expression together with wild-type plants and the *atipt2 9* mutant were grown on MS2 medium with or without 5  $\mu$ M 17- $\beta$ -estradiol (Fig. 4c, d). After 12 days of cultivation, inducer treatment did not provoke significant differences in root length and plant morphology of both non-transgenic control plants. However, the shorter root length and the less developed shoot phenotype of the *atipt2 9* mutant was reverted in the *PcIPT9* line, even in the absence of inducer. Additionally, induction of *PcIPT5a* and *PcIPT6a* resulted in extreme phenotypes typically associated with excess cytokinins, including an extremely short primary root, the absence of lateral roots, the under-development of the shoot, and smaller leaves.

### Cytokinin profiling in different poplar accessions

Since nothing is known about aromatic cytokinin biosynthesis, as a first step towards the identification of the genetic determinants involved, we set out to identify the most suitable poplar model synthesizing both isoprenoid and aromatic cytokinins. To establish the best timing for sampling, aromatic cytokinin levels were measured in fully expanded leaves harvested from mature *P.  $\times$  canadensis* cv. *Robusta* at several time points during a day. As shown in Fig. 5a, a time-dependent accumulation of aromatic cytokinins was observed, with the highest levels of *oT* (253 pmol  $g^{-1}$  FW) and *oTR* (156 pmol  $g^{-1}$  FW) occurring 4 h after daybreak. In contrast, only negligible temporal variations in the levels

**Table 2** Content of free isoprenoid cytokinins before (ctrl) and after (est) 17- $\beta$ -estradiol-induced expression of poplar *PcIPT* genes in *A. thaliana atipt2 9* (tRNA *PcIPT9*) or wild-type Col-0 background (all adenylate *PcIPTs*)

	Cytokinin concentration (pmol g <sup>-1</sup> FW)						
	iPRMP	iPR	iP	<i>t</i> ZRMP	<i>t</i> ZR	<i>c</i> ZRMP	<i>c</i> ZR
WT_ctrl	6.0±0.6	1.3±0.2	0.4±0.1	14±4.0	5.8±0.6	3.4±0.5	0.9±0.1
WT_est	3.8±0.4	0.6±0.1	0.2±0.1	9.4±1.2	2.4±0.2	2.3±0.4	0.5±0.1
<i>atipt2 9</i> _ctrl	10.1±1.3	2.9±0.5	1.0±0.2	10.4±1.7	6.3±0.9	n.d.	n.d.
<i>atipt2 9</i> _est	6.7±0.8	1.3±0.3	0.6±0.1	7.2±0.6	2.4±0.3	n.d.	n.d.
<i>PcIPT9_21-6</i> _ctrl	7.6±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	40±1.5	3.0±0.2	n.d.	0.1±0.1
<i>PcIPT9_21-6</i> _est	3.5±0.8	0.3±0.1	0.3±0.1	49±16	3.9±0.3	0.4±0.1	0.1±0.1
<i>PcIPT9_21-10</i> _ctrl	5.4±0.6	0.5±0.3	n.d.	59±9.3	4.3±1.4	n.d.	0.1±0.1
<i>PcIPT9_21-10</i> _est	3.6±0.2	0.2±0.1	0.4±0.2	17±4.2	1.3±0.1	0.5±0.2	0.1±0.1
<i>PcIPT3_7-7</i> _ctrl	7.8±0.6	0.8±0.1	0.3±0.1	16±1.0	5.7±0.6	2.4±0.4	0.7±0.1
<i>PcIPT3_7-7</i> _est	8.7±0.4	0.7±0.2	0.3±0.1	17±3.6	3.4±0.3	3.7±1.2	0.5±0.1
<i>PcIPT3_7-9</i> _ctrl	7.5±0.3	0.6±0.1	0.3±0.1	16±0.1	4.6±0.2	2.9±1.1	0.7±0.1
<i>PcIPT3_7-9</i> _est	8.1±0.2	0.7±0.1	0.3±0.1	15±1.5	3.0±0.7	3.0±0.2	0.6±0.1
<i>PcIPT5a_1-1</i> _ctrl	7.1±0.5	0.5±0.1	0.3±0.1	16±4.6	1.4±0.4	2.8±0.8	0.4±0.1
<i>PcIPT5a_1-1</i> _est	1841±87	45±17	97±10	296±53	33±4.9	14.8±3.0	0.8±0.1
<i>PcIPT5a_13-10</i> _ctrl	6.8±0.4	0.5±0.1	0.3±0.1	15±1.0	2.9±0.1	2.6±0.4	0.4±0.1
<i>PcIPT5a_13-10</i> _est	1599±63	32±4.5	62±1.8	188±7.3	46±1.8	12±0.6	0.9±0.2
<i>PcIPT5b_3-2</i> _ctrl	7.5±0.4	1.0±0.2	0.4±0.1	15±0.5	4.8±0.3	2.7±0.8	0.7±0.1
<i>PcIPT5b_3-2</i> _est	249±13	6.3±0.8	9.5±0.1	21±4.2	3.0±0.5	2.7±0.3	0.6±0.1
<i>PcIPT5b_5-8</i> _ctrl	6.8±0.3	0.7±0.1	0.3±0.1	7.9±0.9	1.6±0.3	2.6±0.3	0.5±0.1
<i>PcIPT5b_5-8</i> _est	145±10	6.5±1.5	5.4±0.6	16±3.3	3.3±0.7	2.4±0.5	0.6±0.1
<i>PcIPT6a_7-9</i> _ctrl	11±0.9	0.5±0.2	0.6±0.2	31±2.8	4.2±0.6	3.5±0.5	0.6±0.1
<i>PcIPT6a_7-9</i> _est	3352±133	114±34	148±5.2	512±30	177±21	16±0.5	1.3±0.2
<i>PcIPT6a_8-3</i> _ctrl	10.1±0.2	0.6±0.2	0.5±0.1	26±11	3.4±0.6	3.0±0.5	0.6±0.2
<i>PcIPT6a_8-3</i> _est	7534±360	346±144	454±2.7	1015±61	290±35	35±1.2	2.6±0.5
<i>PcIPT6b_8-6</i> _ctrl	6.1±0.2	0.5±0.1	0.4±0.1	29±4.0	2.6±0.4	3.4±0.3	0.4±0.1
<i>PcIPT6b_8-6</i> _est	2720±290	152±42	199±5.3	610±100	44±4.0	23±3.6	1.1±0.2
<i>PcIPT6b_12-8</i> _ctrl	7.2±0.8	0.6±0.2	0.5±0.1	27±2.8	3.3±0.2	2.7±0.2	0.7±0.1
<i>PcIPT6b_12-8</i> _est	1843±97	95±15	103±3.5	344±15	40±3.8	14±2.1	1.1±0.2

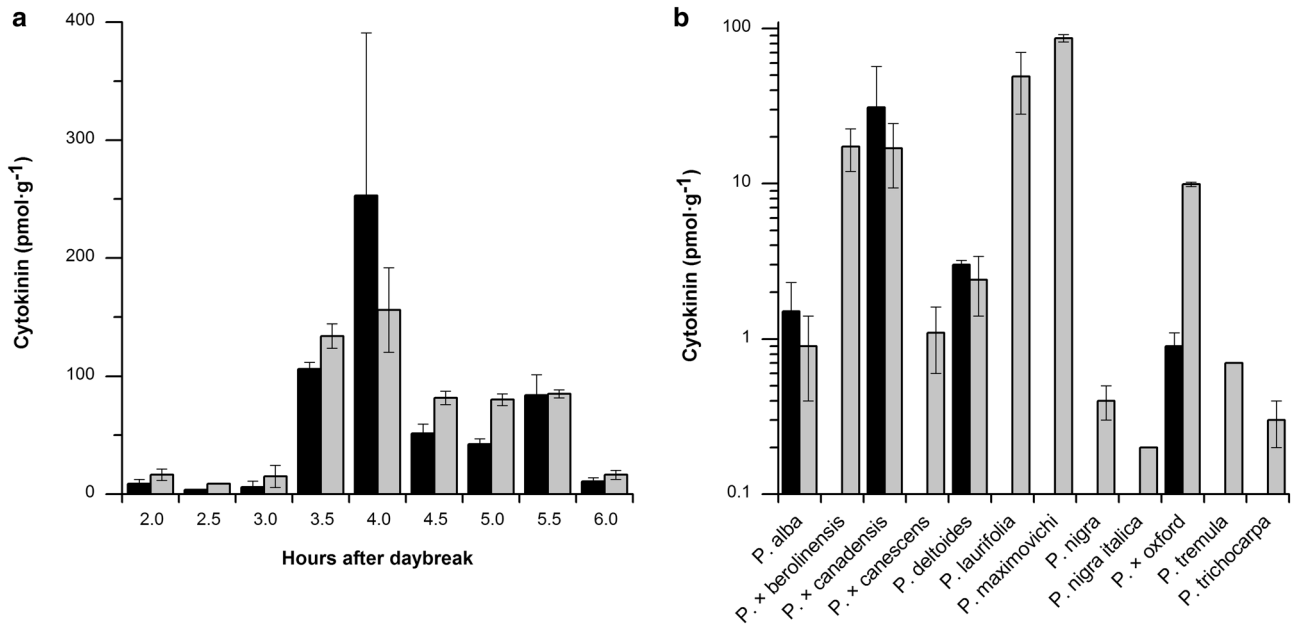
The values represent the mean of three replicates with standard deviations  
n.d. not detected

of *tZ* and its riboside were observed, with average concentrations of 2.2 pmol g<sup>-1</sup> FW and 1.2 pmol g<sup>-1</sup> FW, respectively (Table S7). Therefore, fully expanded leaf samples of young suckers in the lower part of the canopy (mature trees were not accessible) from all 12 gene bank accessions available at the research station of the FGMRI (Kunovice, CZ) were collected 4 h after day break (July 2015) and the content of 10 aromatic cytokinins was quantified using UHPLC-MS/MS (Fig. 5b). In none of the samples BA-, methoxy-*oT*, *mT*-, and *para*-topolin-type aromatic cytokinins were detected, but *oTR* was present in all accessions and especially abundant in *P. × canadensis*, *P. × berolinensis*, *P. laurifolia*, *P. maximovi-chi*, and *P. × oxford*. Surprisingly, except for *P. × canadensis*, *oT* was present only in low quantities or not at all in the accessions tested.

Next, we investigated the tRNA cytokinin content in fully expanded leaves of adult *P. × canadensis* and *P. deltoides* trees. In addition to iPR (50 pmol g<sup>-1</sup> FW) and *cZR*

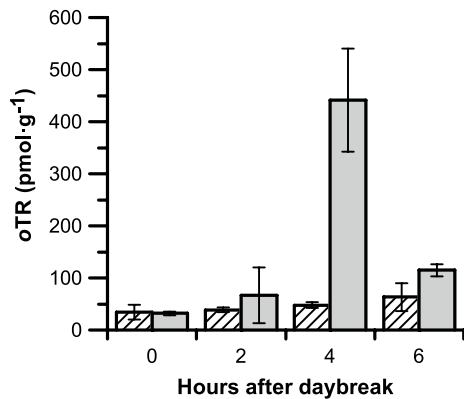
(19 pmol g<sup>-1</sup> FW), also *oTR* (4 pmol g<sup>-1</sup> FW) was found in the tRNA hydrolysates of both accessions. To evaluate the possible occurrence of a time-dependent presence of aromatic cytokinins in the tRNA, the free and tRNA-bound *oTR* concentration was determined in leaf samples harvested from *P. deltoides* trees at different time points (Fig. 6). In agreement with our previous findings, the free *oTR* levels exhibited a diurnal variation with a 13-fold accumulation at 4 h after daybreak. In contrast, the tRNA-bound *oTR* levels varied only slightly and increased steadily in time from 36 to 63 pmol g<sup>-1</sup> FW.

Interestingly, in the latter analyzes it appeared that the free *oTR* levels in the leaves of mature *P. deltoides* trees (Fig. 6) were much higher than those detected in our initial quantifications in leaves of young suckers (Fig. 5b). To corroborate this finding, the levels of free *oT* and *oTR* from old and young *P. × canadensis*, *P. deltoides*, and *P. nigra* trees 4 h after daybreak were compared (Table 3). The older



**Fig. 5** Kinetics of the production of the aromatic cytokinins *oT* (black bars) and *oTR* (gray bars) in *P. x canadensis* and their levels in 12 different poplar species. **a** *oT* and *oTR* levels (pmol g<sup>-1</sup> FW) measured in fully developed leaves harvested from mature

*P. x canadensis* tree at different time points after daybreak. **b** The content of *oT* and *oTR* (pmol g<sup>-1</sup> FW) in fully developed leaves harvested from the lower part of the canopy of 12 poplar species



**Fig. 6** The content of free (gray bars) and tRNA-bound (striped bars) *oTR* in fully developed leaves harvested from the mature part of *P. deltoides* trees during a 6-h period after daybreak

*P. x canadensis* and *P. deltoides* tissues contained much higher free aromatic cytokinin levels compared to those detected in leaves from young suckers. For instance, in *P. deltoides*, the concentration of *oT* in material originating from mature trees was 56-fold higher than that in sucker leaves and the *oTR* levels were up to 185 times higher in the former. Similarly, in *P. x canadensis*, the concentration of *oT* in material originating from mature trees was 17-fold higher than that in sucker leaves and the *oTR* levels were up to 6 times higher in the former. In contrast, in young as well as mature material originating from *P. nigra* trees, aromatic cytokinins were hardly detectable (Table 3).

**Table 3** Level of aromatic cytokinins in fully developed leaves harvested from *P. x canadensis* cv. *Robusta*, *P. deltoides* and *P. nigra* trees 4 h after daybreak

Poplar	Mature tree		Young suckers	
	<i>oT</i> (pmol g <sup>-1</sup> )	<i>oTR</i> (pmol g <sup>-1</sup> )	<i>oT</i> (pmol g <sup>-1</sup> )	<i>oTR</i> (pmol g <sup>-1</sup> )
<i>P. x canadensis</i>	253 ± 138	156 ± 36	15 ± 4	26 ± 4
<i>P. deltoides</i>	169 ± 37	443 ± 98	3.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1
<i>P. nigra</i>	3.9 ± 2.2	0.5 ± 0.3	n.d.	0.4 ± 0.1

The values represent the mean of three replicates with standard deviations  
*n.d.* not detected



## Discussion

The poplar genome has undergone a duplication event from which about 8000 gene pairs survived to the present day; among these are three *IPT* pairs (Tuskan et al. 2006). To get insight into the production of isoprenoid cytokinins in poplar, we cloned all nine *IPT* genes from *P. × canadensis* to allow the analysis of their structure and expression pattern. Especially the *PcIPT7* and the *PcIPT3* genes stood out when considering their sequence. Whereas the *IPT7* genes contained an intron, which is highly uncommon for adenylate *IPTs*, *PcIPT3* was the only *PcIPT* that contained a C-terminal CLVA motif recognized by plant farnesyl transferases. In *A. thaliana*, farnesylation directs the subcellular localization of the *AtIPT3* protein to the nucleus and cytoplasm, while non-farnesylated *AtIPT3* is transported to plastids (Galichet et al. 2008). According to our phylogenetic analysis, both *SIIPT3* and *SIIPT4* are *PcIPT3* orthologues in tomato. Just like *PcIPT3*, *SIIPT3* is mainly expressed in developed leaves while the other orthologue *SIIPT4* is weakly expressed in all studied tomato tissues (Žižková et al. 2015). In the phylogenetic tree, the clade containing both *PcIPT5* proteins also comprised *AtIPT5* and *AtIPT7*, which seem to be of less importance in *A. thaliana* given that the production of isoprenoid cytokinins is not affected in their double knockout mutant (Miyawaki et al. 2006). It seems unlikely that this would also be the case in *P. × canadensis* because *PcIPT5a* has the broadest expression pattern of all adenylate *IPT* genes and additionally the *PcIPT5a* protein has a very high in vivo activity. Concerning the active sites of the seven adenylate *PcIPTs*, their sequences were highly conserved both at the DMAPP and ADP/ATP binding sites, whereas the two tRNA *IPTs* displayed numerous substitutions, which is in agreement with other plant *IPTs*.

Expression analysis revealed that with exception of the tRNA *PcIPT9*, all other *PcIPTs* were downregulated in callus cultured on medium supplemented with *tZ*. This finding is in line with other reports, where the absence of a negative feedback regulation caused by exogenous cytokinin application was also observed for tRNA *IPTs* in *A. thaliana* (Miyawaki et al. 2004) and maize (Vyrubalová et al. 2009). Additionally, the obtained adenylate *PcIPT* expression profiles largely resembled those described in other plants. For instance, when comparing the results of a large-scale cDNA microarray available at the PopGenIE website (<https://popgenie.org>), it appears that also in *P. tremula*, *IPT7a* is not expressed and *IPT7b* is expressed only weakly (Sundell et al. 2015). Similarly, in *P. trichocarpa*, the two *IPT7* genes and *IPT6a* display the weakest expression (Yang et al. 2008). Additionally, *IPT6b* expression seems to be largely restricted to flowers,

not only in *P. × canadensis*, but also in *P. tremula* and in *A. thaliana* (*AtIPT1*, *AtIPT4*, *AtIPT6* and *AtIPT8* genes belong to the same clade as *PcIPT6*; Fig. 2) (Miyawaki et al. 2004). In contrast, the expression pattern of the tRNA *IPT* genes seems less conserved across poplar accessions. Indeed, both in *P. trichocarpa* and *P. tremula*, *IPT2* transcripts are high in roots while those of *IPT9* are especially high in shoots. However, the expression profiles of *PcIPT2* and *PcIPT9* do correspond to those of the *A. thaliana* orthologues (Miyawaki et al. 2004). Altogether, these data show that similar to other plants, most of the *IPT* genes in *P. × canadensis* display a preferential tissue specific expression indicative of functional diversification.

To analyze the functionality of the *PcIPT* genes, they were expressed under an estradiol-inducible promoter in *A. thaliana*. The modest changes in the profile of free isoprenoid cytokinins combined with the wild-type level in tRNA-bound iPR of the transgenic plants, and the complementation of the double knockout mutant *atipt 2 9* phenotype proved that the tRNA *PcIPT9* was indeed a functional equivalent of the *A. thaliana* tRNA *IPTs*. Since the differences in tRNA-bound cytokinins before and after estradiol induction were minor, it seems that the leaky expression of the *PcIPT9* gene was sufficient to modify available sites in the *Arabidopsis* tRNA with a cytokinin moiety. However, given that the tRNA-bound *cZR* level in the *atipt 2 9* mutant was not restored to wild-type levels by *PcIPT9* and based on previous work on tRNA *IPT* knockouts in *A. thaliana* (Miyawaki et al. 2006), we suggest that the *PcIPT2* orthologues are predominantly responsible for the modification of tRNA by *cZR*, while the *PcIPT9* orthologues introduce an iPR moiety. Concerning the adenylate *PcIPTs*, the isoprenoid cytokinin profiles of the transgenic lines were modified to different extents depending on the gene. In transgenic lines of *PcIPT5a*, *PcIPT6a* and *PcIPT6b* the strongest increase in iPRMP was measured which concomitantly resulted in high levels of *tZRMP*. Intriguingly, however, in these plants the level of *cZRMP* was also very high. In fact, the concentration of *tZRMP* was 16- to 32-fold higher than the concentration of *cZRMP* in these lines. In wild-type *A. thaliana*, the production of *cZ*-type cytokinins is strictly associated with tRNA *IPT* activity and tRNA degradation (Miyawaki et al. 2006). To our knowledge, a precursor of a *cZ* side chain has not been identified yet, but the direct formation of *cZRMP* by the action of the *PcIPTs* cannot be excluded. Alternatively, although the conversion from *cis*- to *trans*-zeatin is favored (Bassil et al. 1993; Hluska et al. 2017), in the *PcIPT5a*, *PcIPT6a* and *PcIPT6b* transgenic lines *trans*-*cis* isomerization could be taking place. An enzyme supposedly responsible for this reaction was recently identified in maize as a nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase. Although in vitro the isomerization occurred spontaneously in the presence of FMN and light (Hluska et al. 2017), the

contribution of this enzyme to in vivo isomerization was strongly disputed. A third possibility that should be considered is the hydroxylation of iPRMP to *c*ZRMP by a so far unidentified cytochrome P450 monooxygenase with a different substrate specificity compared to the published CYP735A1 and CYP735A2 enzymes (Takei et al. 2004). Whatever is the underlying mechanism for the observed high *c*ZRMP levels, the phenotype of the transgenic *PcIPT5a* and *PcIPT6a* lines clearly supported the functionality of these *PcIPT* genes. Indeed, the very short primary root, the absence of lateral roots, the under-development of the shoot, and smaller leaves have all been observed in transgenic *A. thaliana* lines overexpressing *AtIPT8* (Sun et al. 2003).

Finally, this study also provided some insights concerning the biosynthetic machinery for the production of aromatic cytokinins. Indeed, the fact that neither free nor tRNA-bound aromatic cytokinins were detected in the transgenic *A. thaliana* lines expressing the *PcIPTs* implies that whereas these proteins are clearly functional enzymes, they are responsible exclusively for the production of isoprenoid cytokinins. Indeed, as a green plant, *A. thaliana* is able to synthesize aromatic compounds via the shikimate, polyketide and phenylpropanoid pathways (Crozier et al. 2007), which could theoretically serve as precursors for the production of aromatic cytokinins. Additionally, although it cannot be excluded that the enzymes required for the transformation of these precursors and the *PcIPT* metabolites into aromatic cytokinins are lacking, structural prediction of the *PcIPT* active site indicates that it is unlikely that an aromatic substrate different from DMAPP would fit the active site cavity. So, as an alternative but essential step towards functional insights into the biosynthesis of aromatic cytokinins, we determined the free and tRNA-bound aromatic cytokinin profile and the kinetics of their production in poplar. This analysis showed that free aromatic cytokinins were widely prevalent amongst poplar as they could be detected in all of the 12 poplar species analyzed, albeit at different concentrations. Interestingly, the results also revealed that aromatic cytokinins were much more prevalent in *P. deltoides* than in *P. nigra*, indicating that the hybrid *P. × canadensis* must have inherited the trait to synthesize aromatic cytokinins from the former parental species. Furthermore, our data for *P. × canadensis* cv. *Robusta* were found to be in good agreement with the cytokinin levels recently determined with the same analytical method in *P. tremula* (Edlund et al. 2017), but there were discrepancies with earlier works. For instance, Horgan et al. (1975) and Strnad et al. (1992) reported tenfold higher aromatic cytokinin levels in *P. × canadensis*, and, in contrast to our findings, *mT*, its riboside and 9-glucoside were detected in this accession (Strnad et al. 1997). It is important to note that those studies used different analytical techniques, but the differences might also be caused by seasonal variations, other environmental factors, plant

pathogens or the timing and age of the sampled material. Indeed, we have observed significantly higher aromatic cytokinin concentrations in the leaves of mature *P. × canadensis* and *P. deltoides* than in young suckers.

Additionally, the concentration of aromatic cytokinins is reported to vary according to the length of exposure to light and its quality (Hewett and Wareing 1973) and we could indeed establish that aromatic cytokinin levels exhibited a diurnal pattern with a peak production 4 h after daybreak. This time-dependent cytokinin production is an interesting point and based on available data it appears that there is a co-operation between light and cytokinin signaling in plant growth and development (Zdarska et al. 2015). However, to unravel the currently unknown underlying molecular mechanisms, experiments directed at the identification of regulatory determinants acting downstream of phytochromes and controlling cytokinin biosynthesis, catabolism, conjugation, interconversion and transport are required. Finally, in contrast to the free *o*TR levels, no time-dependent variation could be detected for the tRNA-bound form. In *A. thaliana*, *c*Z-type are produced exclusively through the activity of tRNA IPTs and the subsequent degradation of the modified tRNA (Miyawaki et al. 2006). However, given the lack of correlation between the diurnal levels of free and tRNA-bound *o*TR, it seems unlikely that tRNA modification is the sole source of *o*TR in poplar. Based on the cytokinin profiling, mature trees of the hybrid *P. × canadensis* and its parent *P. deltoides* appear suitable accessions to explore the biosynthesis and perception of both isoprenoid and aromatic cytokinins. Indeed, although both cytokinin groups display overlapping biological activities (Strnad 1997; Holub et al. 1998; Spíchal et al. 2004), the different dynamics in their levels revealed in this study and the reported existence of binding proteins specific for aromatic cytokinins (Kamínek et al. 2003) suggest that they might have divergent functions in these hardwood trees. In that respect, we are currently finalizing the analyses of all five poplar cytokinin receptors.

## Conclusions

Concerning the production of isoprenoid cytokinins in poplar, the expression profiles as well as their phylogenetic analysis support a functional diversification for the different adenylate *IPTs* in *P. × canadensis* comparable to that observed for other plant *IPTs*. The cytokinin profiles of the transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing the *PcIPT5* paralogs signify that they are mainly implicated in the production of iP-type cytokinins. Supported by the active site composition of the *PcIPT5* proteins, these iP-type cytokinins would then be modified by P450 cytochrome oxidases to produce *tZ* cytokinins. In that context, the relatively high *c*ZRMP levels in transgenic *PcIPT6 Arabidopsis* lines are particularly

interesting. Other experiments are needed to assess the significance of IPTs, cytochromes P450 monooxygenases or *cis*–*trans* isomerization in the formation of *cZ*MP in poplar under physiological conditions. Analysis of the tRNA-bound isoprenoid cytokinins in transgenic *atipt2 9* mutant lines expressing the tRNA *PcIPT9*, supports the enzymatic activity of this protein. Thus, although the heterologous expression of the *PcIPTs* in *E. coli* was not successful, with the expression in *Arabidopsis* we could demonstrate the functionality of both the adenylate and the tRNA IPTs of *P. × canadensis*.

Furthermore, it has become clear that the appropriate timing of sampling and the age of the harvested material is key to the analysis of aromatic cytokinins in poplar. The discrepancy in the results of different research teams can probably be attributed in part to differences in these aspects of the experiments. Additionally, our data indicate that the occurrence of aromatic cytokinins is a relatively widely conserved property amongst the studied poplar accessions. Although the position of *P. × canadensis* as a model for aromatic cytokinin biosynthesis and metabolism is supported by our results, in our opinion *P. deltoides* might be a better model organism for two main reasons. The fact that *P. deltoides* shows the highest level of aromatic cytokinins among all poplar accessions is an important feature for feeding experiments with labeled precursors of the aromatic moiety which could uncover the biochemical origin of the aromatic cytokinins. In addition, an advantage of *P. deltoides* over the hybrid *P. × canadensis* is the availability of both staminate and pistillate individuals.

Last, the genetic determinants of aromatic cytokinin biosynthesis remain to be identified, but based on the cytokinin profiles of the transgenic *PcIPT Arabidopsis* lines it seems unlikely that the adenylate IPTs of *P. × canadensis* are implicated in aromatic cytokinins production. Consequently, the use of labeled intermediates of the shikimate and polyketide pathway, for instance shikimic acid, L-phenylalanine, cinnamic acid or acetyl-CoA, seems the most appropriate approach to move forward into the analysis of the biosynthesis and metabolism of aromatic cytokinins in plants.

**Author contribution statement** PJ, DK, MŠ, and PT conceived and designed research. PJ, DZ, MŠ, ŠK, TH, RK, KP, and PT conducted experiments. PJ, DK, MŠ, ŠK, RK, and PT analyzed data. PJ, DK, MŠ, and PT wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript. Neither the manuscript nor any part of its content has been published or submitted for publication elsewhere.

**Acknowledgements** We thank Dr. Danny Vereecke for valuable comments and editing of the manuscript. We thank Věra Dosedělová for excellent technical assistance. The pMDC7 vector was kindly provided

by Dr. Chua (The Rockefeller University, New York, NY, USA). The seeds of *atipt2 9* double knockout mutant were kindly provided by Prof. T. Kakimoto (Osaka University, Osaka, Japan). Poplar accession of young suckers and calli of *Populus × canadensis* were obtained from Forestry and Game Management Research Institute (Kunovice and Jíloviště, CZ). *Populus deltoides* sequence data were produced by the US Department of Energy Joint Genome Institute <https://www.jgi.doe.gov/> in collaboration with the user community. This work was supported by Grant 15-16888S, Czech Science Foundation, Czech Republic and by Project RO0418 (Sustainable systems and technologies, improving crop production for higher quality of production of food, feed, and raw materials, under conditions of changing climate) funded by Ministry of Agriculture, Czech Republic.

## References

- Andrabi SBA, Tahara M, Matsubara R et al (2018) Plant hormone cytokinins control cell cycle progression and plastid replication in apicomplexan parasites. *Parasitol Int* 67:47–58. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.03.003>
- Bar M, Israeli A, Levy M et al (2016) CLUSA is a MYB transcription factor that promotes leaf differentiation by attenuating cytokinin signaling. *Plant Cell* 28:1602–1615. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00211>
- Bartrina I, Otto E, Strnad M et al (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:69–80. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079079>
- Bassil NV, Mok DWS, Mok MC (1993) Partial purification of a *cis*–*trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* 102:867–872
- Brugière N, Humbert S, Rizzo N et al (2008) A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 (ZmIPT2), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. *Plant Mol Biol* 67:215–229. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9312-x>
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- Chaves Das Neves HJ, Pais MSS (1980) A new cytokinin from the fruits of *Zantedeschia aethiopica*. *Tetrahedron Lett* 21:4387–4390. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)77865-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)77865-8)
- Chu H-M, Ko T-P, Wang AH-J (2010) Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Res* 38:1738–1748. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1093>
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2007) Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (eds) *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 1–22
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133:462–469. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979>
- Doležal K, Āstot C, Hanuš J et al (2002) Identification of aromatic cytokinins in suspension cultured photoautotrophic cells of *Chenopodium rubrum* by capillary liquid chromatography/frit—fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Growth Regul* 36:181–189. <https://doi.org/10.1023/A:1015027906046>
- Edlund E, Novak O, Karady M et al (2017) Contrasting patterns of cytokinins between years in senescing aspen leaves. *Plant Cell Environ* 40:622–634. <https://doi.org/10.1111/pce.12899>

- Elzen GW (1983) Cytokinins and insect galls. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 76:17–19. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90286-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90286-4)
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T et al (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* 62:2431–2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
- Frébortová J, Greplová M, Seidl MF et al (2015) Biochemical characterization of putative adenylate dimethylallyltransferase and cytokinin dehydrogenase from *Nostoc* sp. PCC 7120. *PLoS ONE* 10:e0138468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138468>
- Frébortová J, Plíhal O, Florová V et al (2017) Light influences cytokinin biosynthesis and sensing in *Nostoc* (cyanobacteria). *J Phycol* 53:703–714. <https://doi.org/10.1111/jpy.12538>
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M et al (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of cis-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot* 62:2827–2840. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq457>
- Galichet A, Hoyerová K, Kamínek M, Gruissem W (2008) Farnesylation directs AtIPT3 subcellular localization and modulates cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 146:1155–1164. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107425>
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270:1986–1988
- Giron D, Frago E, Glevarec G et al (2013) Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. *Funct Ecol* 27:599–609. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12042>
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V et al (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hewett EW, Wareing PF (1973) Cytokinins in *Populus × robusta* (schneid): light effects on endogenous levels. *Planta* 114:119–129. <https://doi.org/10.1007/BF00387470>
- Hluska T, Šebela M, Lenobel R et al (2017) Purification of maize nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase casts doubt on the existence of zeatin cis-trans isomerase in plants. *Front Plant Sci* 8:1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01473>
- Holub J, Hanuš J, Hanke DE, Strnad M (1998) Biological activity of cytokinins derived from *ortho*- and *meta*-hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regul* 26:109–115. <https://doi.org/10.1023/A:1006192619432>
- Horgan R, Hewett EW, Purse JG, Wareing PF (1973) A new cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron Lett* 14:2827–2828. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)96062-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96062-9)
- Horgan R, Hewett EW, Horgan JM et al (1975) A new cytokinin from *Populus × robusta*. *Phytochemistry* 14:1005–1008. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85176-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85176-4)
- Houba-Hérin N, Pethe C, d'Alayer J, Laloue M (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J Cell Mol Biol* 17:615–626
- Immanen J, Nieminen K, Silva HD et al (2013) Characterization of cytokinin signaling and homeostasis gene families in two hardwood tree species: *Populus trichocarpa* and *Prunus persica*. *BMC Genom* 14:885. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-885>
- Jones LH, Martinková H, Strnad M, Hanke DE (1996) Occurrence of aromatic cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Plant Growth Regul* 15:39–49. <https://doi.org/10.1007/BF00213133>
- Kabbara S, Schmülling T, Papon N (2018) CHASEing cytokinin receptors in plants, bacteria, fungi, and beyond. *Trends Plant Sci* 23:179–181. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.001>
- Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* 42:677–685. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce112>
- Kamínek M, Trcková M, Fox JE, Gaudinová A (2003) Comparison of cytokinin-binding proteins from wheat and oat grains. *Physiol Plant* 117:453–458
- Kopečná M, Blaschke H, Kopečný D et al (2013) Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. *Plant Physiol* 163:1568–1583. <https://doi.org/10.1104/pp.113.228775>
- Krall L, Raschke M, Zenk MH, Baron C (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett* 527:315–318
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M et al (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445:652–655. <https://doi.org/10.1038/nature05504>
- Matsuo S, Kikuchi K, Fukuda M et al (2012) Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *J Exp Bot* 63:5569–5579. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers207>
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J Cell Mol Biol* 37:128–138
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M et al (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16598–16603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603522103>
- Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh NN (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem Biophys Res Commun* 255:328–333. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0199>
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M et al (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20032–20037. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805617106>
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P et al (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69:2214–2224. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.04.022>
- Persson BC, Esberg B, Ólafsson Ó, Björk GR (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* 76:1152–1160. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0300-9084(94)90044-2)
- Rittenberg D, Foster GL (1940) A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *J Biol Chem* 133:737–744
- Robischon M (2015) Do cytokinins function as two-way signals between plants and animals? Cytokinins may not only mediate defence reactions via secondary compounds, but may directly interfere with developmental signals in insects. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 37:356–363. <https://doi.org/10.1002/bies.201400099>
- Sakamoto T, Sakakibara H, Kojima M et al (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiol* 142:54–62. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085811>
- Samanovic MI, Tu S, Novák O et al (2015) Proteasomal control of cytokinin synthesis protects *Mycobacterium tuberculosis* against nitric oxide. *Mol Cell* 57:984–994. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.024>
- Schultz JC (2002) Shared signals and the potential for phylogenetic espionage between plants and animals. *Integr Comp Biol* 42:454–462. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.454>
- Schultz JC, Appel HM (2004) Cross-kingdom cross-talk: hormones shared by plants and their insect herbivores. *Ecology* 85:70–77

- Seif E, Hallberg BM (2009) RNA-protein mutually induced fit: structure of *Escherichia coli* isopentenyl-tRNA transferase in complex with tRNA(Phe). *J Biol Chem* 284:6600–6604. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800235200>
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11:118–130
- Smant G, Helder J, Govere A (2018) Parallel adaptations and common host cell responses enabling feeding of obligate and facultative plant parasitic nematodes. *Plant J* 93:686–702. <https://doi.org/10.1111/tpj.13811>
- Spallek T, Gan P, Kadota Y, Shirasu K (2018) Same tune, different song—cytokinins as virulence factors in plant–pathogen interactions? *Curr Opin Plant Biol* 44:82–87. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.002>
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M et al (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* 45:1299–1305. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch132>
- Stes E, Vandeputte OM, El Jaziri M et al (2011) A successful bacterial Coup d'Etat: how *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Annu Rev Phytopathol* 49:69–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095217>
- Stirk WA, van Staden J (2010) Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regul* 62:101–116. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9481-x>
- Strnad M, Peters W, Beck E, Kamínek M (1992) Immunodetection and identification of N6-(o-hydroxybenzylamino)purine as a naturally occurring cytokinin in *Populus × canadensis* Moench cv *Robusta* leaves. *Plant Physiol* 99:74–80
- Strnad M, Peters W, Hanuš J, Beck E (1994) *Ortho*-topolin-9-glucoside, an aromatic cytokinin from *Populus × canadensis* cv *Robusta* leaves. *Phytochemistry* 37:1059–1062. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89528-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89528-X)
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* 101:674–688. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x>
- Strnad M, Hanus J, Vanek T et al (1997) *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus × canadensis* moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry* 45:213–218. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00816-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00816-3)
- Sun J, Niu Q-W, Tarkowski P et al (2003) The *Arabidopsis* AtIPT8/PGA22 gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol* 131:167–176. <https://doi.org/10.1104/pp.011494>
- Sundell D, Mannapperuma C, Netotea S et al (2015) The plant genome integrative explorer resource: PlantGenIE.org. *N Phytol* 208:1149–1156. <https://doi.org/10.1111/nph.13557>
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K et al (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* 42:107–113. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce037>
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276:26405–26410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102130200>
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *J Biol Chem* 279:41866–41872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406337200>
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S et al (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596–1604. <https://doi.org/10.1126/science.1128691>
- Vrabka J, Niehaus E-M, Münsterkötter M et al (2019) Production and role of hormones during interaction of *Fusarium* species with maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01936>
- Vyroubalová Š, Václavíková K, Turečková V et al (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol* 151:433–447. <https://doi.org/10.1104/pp.109.142489>
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S et al (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46:W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10487–10492. <https://doi.org/10.1073/pnas.171304098>
- Werner T, Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 12:527–538. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.002>
- Yang X, Kalluri UC, Jawdy S et al (2008) The F-box gene family is expanded in herbaceous annual plants relative to woody perennial plants. *Plant Physiol* 148:1189–1200. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121921>
- Zdarska M, Dobisová T, Gelová Z et al (2015) Illuminating light, cytokinin, and ethylene signalling crosstalk in plant development. *J Exp Bot* 66:4913–4931. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv261>
- Zhou C, Huang RH (2008) Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16142–16147. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805680105>
- Žižková E, Dobrev PI, Muhovski Y et al (2015) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) SIIPT3 and SIIPT4 isopentenyltransferases mediate salt stress response in tomato. *BMC Plant Biol* 15:85. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0415-7>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

# Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins

Pavel Jaworek<sup>1,2</sup>, Petr Tarkowski<sup>1,3</sup>, Tomáš Hluska<sup>3</sup>, Štěpán Kouřil<sup>1</sup>, Ondřej Vrobel<sup>1,3</sup>, Jaroslav Nisler<sup>4</sup>, David Kopečný<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Phytochemistry and <sup>2</sup>Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 27, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 29, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>4</sup>Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, AS CR & Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

\*Corresponding author

David Kopečný: david.kopecny@upol.cz; Tel.: +420 585634840, Fax: +420 585634933

**RUNNING TITLE:** Cytokinin receptors in poplar

## MAIN CONCLUSION

Five poplar CHASE-containing histidine kinase receptors bind cytokinins and display kinase activities. Both endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins bind to the receptors in live cell assays.

## ABSTRACT

Cytokinins are phytohormones that play key roles in various developmental processes in plants. The poplar species *Populus × canadensis* cv. *Robusta*, is the first organism found to contain aromatic cytokinins. Here, we report the functional characterization of five CHASE-containing histidine kinases from *P. × canadensis*: PcHK2, PcHK3a, PcHK3b, PcHK4a and PcHK4b. A qPCR analysis revealed high transcript levels of all *PcHKs* other than *PcHK4b* across multiple poplar organs. The ligand specificity was determined using a live cell *Escherichia coli* assay and we provide evidence based on UHPLC-MS/MS data that ribosides can be true ligands. PcHK2 exhibited higher sensitivity to iP-type cytokinins than the other receptors, while PcHK3a and PcHK3b bound these cytokinins much more weakly because they possess two isoleucine residues that clash with the cytokinin base and destabilize its binding. All receptors display kinase activity but their activation ratios in the presence/absence of cytokinin differ significantly. PcHK4a displays over 400-fold higher kinase activity in the presence of cytokinin, suggesting involvement in strong responses to changes in cytokinin levels. *trans*-Zeatin was both the most abundant cytokinin in poplar and that with the highest variation in abundance, which is consistent with its strong binding to all five HKs and activation of cytokinin signaling via A-type response regulators. The aromatic cytokinins' biological significance remains unclear, their levels vary diurnally, seasonally, and annually. PcHK3 and PcHK4 display the strongest binding at pH 7.5 and 5.5, respectively, in line with their putative membrane localization in the endoplasmic reticulum and plasma membrane.

**Keywords:** aromatic cytokinin; histidine kinase; hormone; isoprenoid cytokinin; poplar; topolin

**Abbreviations:** 3FMTDZ, 1-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-3-(3-trifluoromethoxy-phenyl)urea; BAP, *N*<sup>6</sup>-benzyladenine; *cZ*, *N*<sup>6</sup>-(*cis*-4-hydroxy-3-methyl-2-buten-1-yl)adenine i.e. *cis*-zeatin; *iP*, *N*<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenine; *iPR*, *N*<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenosine; *mT*, *meta*-topolin; HETDZ, 1-[2-(2-hydroxyethyl)phenyl]-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea; HK, histidine kinase; *oT*, *ortho*-topolin; RR, response regulators; TDZ, *N*-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)-*N'*-phenylurea i.e. thidiazuron; *tZ*, *trans*-zeatin; *tZR*, zeatin riboside

## Introduction

The cytokinins are adenine-derived phytohormones that regulate cell proliferation and differentiation, shoot and root growth, development, and responses to various environmental stimuli including biotic and abiotic stress (Werner and Schmülling 2009; Kieber and Schaller 2014). Two groups of cytokinins, aromatic and isoprenoid, can be distinguished based on the nature of their *N*-substituents. Isoprenoid cytokinins are ubiquitous in higher plants and include the most biologically active species *trans*-zeatin (*tZ*) and *N*<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenine (*iP*) as well as less bioactive analogs such as *cis*-zeatin (*cZ*) and dihydrozeatin (Spíchal et al. 2004; Lomin et al. 2011; Kuderová et al. 2015). Aromatic cytokinins are rare and may have different biological functions to their isoprenoid counterparts (Strnad 1997). Notable aromatic cytokinins include 6-benzylaminopurine (BAP) and *ortho*- (*oT*) and *meta*-topolin (*mT*). Aromatic cytokinins were shown to induce changes in chlorophyll a and b levels (Dobrąnszki and Mendler-Drienyovszki, 2014). Both isoprenoid and aromatic cytokinins also exist as ribosides, 9-glucosides, and other derivatives (Mok and Mok 2001). Ribosides, considered in general as a transport form of the hormone (Beveridge et al. 1997; Corbesier et al. 2003; Hirose et al. 2008), can be metabolized by nucleoside-N-ribohydrolase (NRH) to the active form (cytokinin base) in cytosol (Kopečná et al. 2013).

The cytokinin signal is perceived and mediated by a multistep His-Asp phosphorelay cascade, which activates type-B response regulators (RR) that function as transcriptional activators in the nucleus (Hwang and Sheen 2001; Müller and Sheen 2008). Among the genes transcribed upon B-type RRs activation are smaller A-type RRs acting as negative regulators of the initial signal transduction pathway (To et al., 2004). The A-type RRs are cytokinin primary response genes (D'Agostino et al., 2000; Rashotte et al., 2003). Cytokinin receptors are hybrid-type transmembrane sensor histidine kinases (HKs) (Inoue et al. 2001; Suzuki et al. 2001; Ueguchi et al. 2001) that are autophosphorylated at a conserved His residue in the HK domain, and subsequently at an Asp residue in the receiver domain, upon cytokinin binding. The cytokinin binding site is at an N-terminal extracytoplasmic binding domain known as the CHASE (Cyclase/Histidine kinase Associated Sensory Extracellular) domain, which comprises ~ 270 amino acids (Heyl et al. 2007) surrounded by transmembrane (TM) domains of ~ 20 - 25 amino acids. Receptors are predominantly localized in the membrane of the endoplasmic reticulum (Caesar et al. 2011; Lomin et al. 2011; Wulfetange et al. 2011). The best described cytokinin receptors are three HKs from *Arabidopsis* (AHK2, AHK3 and AHK4) (Ueguchi et al. 2001). The crystal structure of the CHASE domain of AHK4 (Hothorn et al. 2011) has been solved, revealing that it forms a dimer and explaining previously reported ligand specificity (Spíchal et al. 2004; Romanov et al. 2006). Other organisms with biochemically characterized cytokinin receptors include maize (Yonekura-Sakakibara et al. 2004), rice (Choi et al. 2012), rapeseed (Kuderová et al. 2015), the apple tree (Daudu et al. 2017), and potato (Lomin et al. 2018). The pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* also senses cytokinin *via* HKs (Wang et al. 2017), which induces a bacterial response to oxidative stress.

Plant HKs display high redundancy with overlapping specificities, functions, interactions and gene expression, at least in *Arabidopsis thaliana* (Dortay et al. 2006; Stolz et al. 2011). While *ahk2 ahk4* and *ahk3 ahk4* double mutants exhibited only minor phenotypic differences from the wild type (Nishimura et al. 2004; Higuchi et al. 2004; Riefler et al. 2006), studies on the dwarfed *ahk2 ahk3* double mutant revealed that AHK2 and AHK3 play important roles in leaf development. AHK3 regulates leaf senescence (Kim et al. 2006). Conversely, AHK4 activity is required for the morphogenesis of vascular tissues in roots (Mähönen et al. 2000). Cytokinin signaling is also involved in the formation of legume root nodules: spontaneous nodulation in a *Lotus japonicus* mutant was linked to a gain-of-function mutation in the *HK1* gene (Tirichine et al. 2007). This mutation L266F affected the sequence of the CHASE domain, making the mutant protein constitutively

active even without cytokinin binding. Constitutively active variants of the *Arabidopsis* AHK4 receptor have also been described (Miwa et al. 2007). All these variants feature mutations in a narrow region extending from the TM to the HK domain. Gain-of-function mutants of the *AHK2* and *AHK3* genes, named *repressor of cytokinin deficiency2* (*rock2*) and *rock3*, caused increased shoot growth, leaf and flower size, and seed yield (Bartrina et al. 2017). Interestingly, the *rock3-1* and *rock3-2* mutant genes encode AHK3 variants with point mutations in the CHASE domain (T179I and E182K, respectively).

Here we present a study on a family of cytokinin receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta*, a hybrid of *P. deltoides × P. nigra*. We chose *P. × canadensis* as a model because it is the first organism reported to contain aromatic cytokinins: *oT* (Strnad et al. 1992), *ortho*-topolin riboside (Hewett and Wareing 1973; Horgan et al. 1973), *ortho*-topolin-9-glucoside (*oT9G*) (Strnad et al. 1994), *mT*, and its sugar conjugates (Strnad et al. 1997) have been detected in extracts of its leaves. We recently analyzed the occurrence of aromatic cytokinins in various poplar species (Jaworek et al. 2019). All five poplar *HK* genes were cloned and putative cytokinin receptors were analyzed using a live-cell competitive assay to determine ligand specificities and kinase activities. We also investigated the genomic organization of the *HK* genes and their expression patterns in poplar by qPCR.

## Materials and methods

### Biological material and growth conditions

The majority of *Populus × canadensis* (cv. *Robusta*) samples were collected from a tree growing in the urban environment (Olomouc, CZ, 49°35'44"N, 17°13'39"E). Samples for the determination of seasonal changes in cytokinin content were collected at a set time after daybreak between 25 May and 29<sup>th</sup> September 2017. A total of 48 data points represent values in samples collected every second week in two biological replicates (each replicate was a mixture of five leaves), which were measured in triplicate. Roots were obtained from poplar twigs rooted in a tap water for two weeks. Calli were grown in a growth chamber at 23/21 °C (day/night), with a 14 h photoperiod (140 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) on MS medium with vitamins at pH 5.7 solidified with 0.7% (w/v) plant agar (Duchefa) and supplemented with 2% (w/v) sucrose, glutamine (AppliChem) at 10 mg l<sup>-1</sup>, glycine at 2 mg l<sup>-1</sup>, *tZ* at 0.2 mg l<sup>-1</sup>, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid at 1.0 mg l<sup>-1</sup> (Duchefa). Sub-cultivation was performed every two weeks. All samples were frozen in liquid nitrogen.

### Cloning and construct preparation

Gene-specific primers (Table S1) for amplification of *P. × canadensis* *HK* genes, abbreviated as *PcHKs*, were designed based on previously identified corresponding sequences from *Populus trichocarpa* (Immanen et al. 2013). The Phytozome 12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) identification numbers of individual sequences are presented in Table 1. Total RNA was extracted from *P. × canadensis* leaves or calli using the RNAqueous isolation kit and treated with Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized with RevertAid H Minus reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) for PCR amplification with Q5 DNA polymerase from New England Biolabs (NEB). All *PcHK* ORFs were ligated into a Zero Blunt vector (Thermo Fisher Scientific), transformed into NEB 10-β competent *E. coli* cells for plasmid production, and sequenced. A similar procedure was used for genes encoding ubiquitin extension protein 1 (UBQ1; GeneBank XP\_002318470) and α-tubulin 2 (TUA2; GeneBank XP\_002303998), which were used as a reference genes for qPCR. All *HK* genes were further subcloned into the pNIIIΔEH vector (kindly provided by David Zalabák, Palacký University, CZ) (Suzuki et al. 2001; Yamada et al. 2001) using its *Bam*HI and *Spe*I restriction sites and preserving the GATT motif in front of the start codon. The constructs were transformed into *Escherichia coli* strain KMI001 (kindly provided by David Zalabák, Palacký University, CZ) for use in cytokinin binding and receptor activation assays. Because the natural ORFs of *PcHK2*, *PcHK3a*, *PcHK3b* and *PcHK4a* contain *Bam*HI or *Spe*I sites, these were further codon optimized (GenScript).



### ***qPCR analysis of PcHK and PcRR expression***

Total RNA from individual tissues and calli of *P. × canadensis* was extracted using the RNAqueous isolation kit and treated with Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific) twice. Expression of A-type response regulator genes (*PcRR*) was analyzed in freshly cut leaves from mature trees. Leaf stalks were incubated in 1  $\mu\text{M}$  *tZ*, 0.5  $\mu\text{M}$  *oT* and 0.5  $\mu\text{M}$  *oTR* for 4 hours. Alternatively, freshly cut young twigs were treated with 2  $\mu\text{M}$  *tZ* and BAP for 24 hours. cDNA was synthesized using the RevertAid H Minus reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) with random hexamer primers. RNA from a pool of 15-20 poplar organ samples (flowers, buds, leaves etc.) was transcribed in two independent reactions. All subsequent PCR analyses of cDNA samples were performed in triplicate. The qPCR reaction mixture contained cDNA, 200 nM FAM-TAMRA probe, 400 nM primers, and Luna<sup>®</sup> universal probe qPCR master mix (NEB). Primer Express 3.0 software (Thermo Fisher Scientific) was used for primer and probe design (Table S1). Data were recorded using the QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). PCR efficiencies and specificities of designed probes and primer pairs were verified using plasmid DNA carrying ORFs of the poplar *HK* genes. Cycle threshold values were normalized with respect to the amplification efficiency of two housekeeping genes *UBQ1* and *TUA2*.

### ***Phylogenetic analysis and cytokinin binding site comparison***

An amino acid alignment of the HK sequences was generated using T-Coffee (Notredame et al. 2000) and then treated with Gblocks (Castresana 2000). A maximum likelihood phylogeny with bootstrap analysis was constructed with PhyML v3.0 using the LG amino acid replacement matrix (Guindon et al. 2010). The phylogeny included HK sequences from *Arabidopsis thaliana* (AHKs) (Ueguchi et al. 2001), *Brassica napus* (BnHKs) (Kuderová et al. 2015), *Malus domestica* (MdHKs) (Daudu et al. 2017), *Oryza sativa* (OsHKs) (Du et al. 2007), *P. × canadensis* (PcHKs; Table 1), *Solanum tuberosum* (StHKs) (Lomin et al. 2018), and *Zea mays* (ZmHKs) (Yonekura-Sakakibara et al. 2004). A sequence logo was generated using Weblogo from the sequences used in the phylogenetic analysis together with sequences from *Prunus persica* (Immanen et al. 2013) and sequences from *Hordeum vulgare*, *Kalanchoe laxiflora*, *Salix purpurea*, and *Solanum lycopersicum* retrieved from the Phytozome 12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) or Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) databases. Models of the poplar receptor sensor domains were constructed with Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org>) using the dimeric domain of the AHK4 crystal structure (PDB ID 3T4L) (Hothorn et al. 2011) as a template. The resulting models of the PcHK4a and PcHK4b CHASE domains display an average RMSD of 0.15 Å and share 83% sequence identity with that of *Arabidopsis* AHK4. Models of the PcHK2, PcHK3a and PcHK3b CHASE domains display an average RMSD of 0.25 Å and share 66-68% sequence identity with that of *Arabidopsis* AHK4. HK sequences from *P. × canadensis*, *P. trichocarpa* and *P. deltoides* were nearly identical as shown in Table S2.

### ***Cytokinin binding assay***

The PcHKs' binding properties were analyzed using a live cell competitive binding assay (Romanov et al. 2005, 2006) with slight modifications as described previously (Kuderová et al. 2015). Radiolabeled transzeatin ([2-<sup>3</sup>H]zeatin, 1.3 TBq/mmol) was obtained from the Isotope Laboratory, Institute of Experimental Botany (Prague, CZ). Bacterial cultures were grown in liquid M9 medium supplemented with 0.1% (w/v) casamino acids, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ampicillin and 100  $\mu\text{M}$  IPTG at 25 °C overnight up to an OD<sub>600</sub> of 0.7–0.8. Samples of the bacterial suspension (1 ml) were then transferred to Eppendorf tubes, incubated for 30 minutes, and centrifuged at 6000 x g for 6 minutes. The resulting bacterial pellet was resuspended in 1 ml of a scintillation cocktail (Beckman, USA) and its radioactivity was monitored using a Hidex 300 SL scintillation counter (Hidex). A high excess of unlabeled *tZ* (at least 3000-fold) was used for competition to discriminate between specific and non-specific binding. Mean  $K_D$  values were determined based on three independent Scatchard analyses (Scatchard 1949) using GraphPad Prism 5.1 (<http://www.graphpad.com/>). Competitive assays to determine  $IC_{50}$  values were performed at pH 7.0 using 2.5 nmol l<sup>-1</sup> [<sup>3</sup>H]-*tZ* for PcHK2, PcHK3a and PcHK3b or 5 nmol l<sup>-1</sup> [<sup>3</sup>H]-*tZ* for PcHK4a and PcHK4b samples, with or without unlabeled

cytokinins at various concentrations, and 0.1% (v/v) dimethylsulphoxide (DMSO).  $K_i$  values were calculated using the equation  $K_i = IC_{50}/(1+[radioligand]/K_D)$  (Cheng and Prusoff 1973), where  $K_D$  denotes the radioligand's affinity for the receptor being studied. The optimal pH was studied using 100 mM MES and MOPS buffers in pH range from 5.5 to 8.0. Prior to measurements, bacterial cultures were resuspended in liquid M9 medium containing 10 fold lower concentration of phosphate salts. Riboside stability was studied using the same concentration of iP and iPR (25 nM for PcHK2, 900 nM for PcHK3b and 125 nM for PcHK4a). In parallel, 30 µg of pure maize NRH2b (Kopečná et al. 2013) were added to the reactions with iPR to release free iP either at 4°C or at room temperature for 30 minutes.

### **Receptor activation assay**

The *E. coli* KMI001 strains express the HK receptor  $\rightarrow$  YojN  $\rightarrow$  RcsB  $\rightarrow$  cps::lacZ pathway, enabling reporter gene activation upon cytokinin binding (Takeda et al. 2001). The ability of the PcHK receptors to trigger phosphorelay signaling was verified by monitoring the strains'  $\beta$ -galactosidase activity in the absence or presence of *tZ* as described by (Kuderová et al. 2015) with slight modifications. Bacterial precultures were grown in liquid M9 medium (pH 7.0) supplemented with 0.1% (w/v) casamino acids and 100 µg ml<sup>-1</sup> ampicillin at 25 °C up to an OD<sub>600</sub> of 0.6. Precultures were diluted with fresh media containing 100 µM IPTG at ratios of 1:100 for strains expressing *PcHK2*, 1:5 for *PcHK3a*, 1:500 for *PcHK3b*, and 1:5 for *PcHK4a* and *PcHK4b*. Each preculture was then split into two batches; solvent was added to one (the control) and *tZ* at a final concentration of 1 µM to the other. Three aliquots of 200 µl from each culture were transferred to a 96-well plate and incubated for 18 h at 25 °C, with shaking at 250 rpm. At the end of the incubation, the OD<sub>600</sub> values of these samples were measured using a Synergy™ H4 hybrid multi-mode microplate reader (Biotek), and a 50 µl subsample from each well was transferred to a new 96-well plate containing 2 µl of 25 mM 4-methyl umbelliferyl galactoside (Sigma-Aldrich) in each well. After a 15 min incubation at 37 °C, the reaction was stopped by adding 100 µl of a pH 10.7 solution (NaOH) containing 130 mM glycine and 80 mM sodium carbonate. The fluorescence of 4-methylumbelliferone was measured using a plate reader at excitation and emission wavelengths of 365 and 460 nm, respectively. The ratio of the fluorescence signal to the product of the OD<sub>600</sub> and cultivation time was used to compare the  $\beta$ -galactosidase activity of the controls and *tZ*-supplemented samples.

### **Analysis of cytokinin content**

Isoprenoid cytokinins were isolated and purified according to (Bar et al. 2016) using 3 pmol of heavy-labeled standards (<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-*tZ*, <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-*cZ*, <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-iP, <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-iPR, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-*tZR*, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-*cZR*, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-DHZR, <sup>2</sup>H<sub>6</sub>-iPRMP, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-*tZ9G*, <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-*cZ9G*, <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-DHZ9G) (OlChemIm, Olomouc, CZ). Cytokinins were isolated by solid-phase extraction with a strong cation exchanger (Agilent Technologies), concentrated under reduced pressure at 37 °C, and analyzed by UHPLC-MS/MS (LCMS-8050, Shimadzu) according to (Novák et al. 2008). The resulting data were processed using the standard isotope dilution method (Rittenberg and Foster 1940). Molar concentrations of cytokinins were calculated by assuming a relative water content of 95% for leaf tissue (Sorrentino et al. 2016) in order to compare hormone levels in leaves to the receptors'  $K_i$  values.

The identity and levels of iP and iPR incubated with *E. coli* cell cultures expressing PcHK4a were determined via UHPLC-MS/MS (LCMS-8050, Shimadzu) according to Novák et al. (2008). Samples for analysis were prepared by liquid-liquid extraction of cultivation media with diethyl ether. Three ether aliquots for each sample were pooled and concentrated under reduced pressure at 30 °C prior to analysis.

### **Accession numbers**

Sequence data can be found in the GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) data library under accession numbers MH248795 for *PcHK2*, MH248793 for *PcHK3a*, MH248794 for *PcHK3b*, MH248791 for *PcHK4a* and MH248792 for *PcHK4b*. Alternatively spliced PcHK2 sequences were also submitted as MH248796 for *PcHK2\_v1* and MH248797 for *PcHK2\_v2*.

## Results

### *HK genes in Populus × canadensis cv. Robusta and their phylogeny*

A detailed analysis of the *Populus trichocarpa* genome revealed the existence of five putative cytokinin receptors, all of which are CHASE-containing HKs (Table 1) (Pils and Heyl 2009; Immanen et al. 2013). The high number of these receptors in poplar compared to *Arabidopsis* is due to a whole-genome duplication event in the *Salicaceae* family, from which almost 8000 pairs of paralogous genes have survived in poplar to the present day (Tuskan et al. 2006). We cloned all ORFs of the five HKs found in *P. × canadensis* (for accession numbers, see Table 1) including several splicing variants of *PcCHK2*. The *PcCHK2* gene lies on chromosome 9 and comprises 13 exons (Fig. S1). The exon number and lengths of *HK2* orthologues, including those from *Arabidopsis* and maize, are conserved except for the first exon of *PcCHK2*, which is about 150 bp longer. Additionally, there are two *PcCHK3* paralogues on chromosomes 1 and 14 with 10 exons, and two *PcCHK4* paralogues on chromosomes 8 and 10 with 11 exons. Uniquely, the *Arabidopsis AHK4* gene contains an additional first exon and longer second exon that encode an extra membrane-anchored N-terminal helix (Ueguchi et al. 2001; Hothorn et al. 2011). In line with increasing length of N-terminal part of sequences, both *PcCHK4* comprise two TM segments, both *PcCHK3* have 3 TM segments and *PcCHK2* comprises even 4 TM segments (Table S3).

The phylogenetic tree constructed from the HK sequences of the seven studied plant species (which include both monocots and dicots) shows that the receptors cluster into three main clades (Fig. 1). Each clade contains one of the *Arabidopsis* receptors with established numbering; this pattern is also observed for the poplar, potato (Lomin et al. 2018), and apple tree (Daudu et al. 2017) orthologues. *Brassica napus* is the only analyzed species (Kuderová et al. 2015) without representation in all clades: it lacks an *AHK4* orthologue but has four members of the *HK2* clade.

### *Expression profile of poplar HKs*

The gene expression of the five *PcCHKs* was analyzed in various poplar organs by qRT-PCR (Fig. 2). Their transcript copy numbers varied between 600 and 2200 per 1 ng of RNA (Table S4). *PcCHK2* is the most abundant *HK* gene, and is expressed strongly in all organs. The evolution of paralogous genes often leads to functional diversification, as appears to have happened in the case of the *PcCHK4* genes based on their distinct expression profiles. The two *PcCHK3* paralogues exhibit similar expression patterns, with their transcripts being most abundant in young leaves, roots and flowers. However, the only strongly expressed *PcCHK4* paralogue was *PcCHK4a*, which is mostly expressed in roots and axillary meristems.

### *Functional analysis of poplar HKs using isoprenoid cytokinins*

A functional analysis of all five cloned *PcCHK* protein-encoding genes with conserved CHASE domains was performed to determine whether they can function as genuine cytokinin receptors. A modified direct binding assay using *E. coli* strains expressing individual full-length ORFs of five *PcCHKs* was used (Romanov et al. 2005, 2006; Kuderová et al. 2015) to obtain saturation curves for [<sup>3</sup>H]-*tZ* (Fig. 3a). All five *PcCHKs* display strong *tZ* binding affinities with estimated  $K_D$  values from 1.8 nM for *PcCHK3a* to 5.5 nM for *PcCHK4b*. The effect of pH on binding strength was analyzed in pH range from 5.5 to 8.0 (Fig. 3b). *PcCHK2* displayed a maximal binding at pH 6.5, while curves of both isoforms *PcCHK3* as well as of *PcCHK4* showed opposite trends. Cytokinin binding to *PcCHK3* receptors increased steadily towards higher pH values. On the other hand, binding to *PcCHK4* receptors decreased linearly from a maximal value at pH 5.5. The receptors' kinase activities were also analyzed using *tZ* in a bacterial activation assay (Suzuki et al. 2001). All five receptors exhibited kinase activity and thus are functional cytokinin receptors. Uniquely, *PcCHK3b* exhibited a relatively high background activity level (60% of that observed in the presence of 1  $\mu$ M *tZ*) in the absence of cytokinins (Fig. S2). The fold activation value (i.e. the ratio of kinase activity in the presence and absence of *tZ*) for *PcCHK4a* was 400, whereas those for *PcCHK2* and *PcCHK3b* were only 6 and 2, respectively (Fig. 3c).

The receptors' ligand specificities were investigated using isoprenoid and aromatic cytokinins including bases and ribosides (Fig. 4) by determining their  $IC_{50}$  (inhibitory concentration 50 %) values, i.e.

the concentrations of unlabeled ligands required to reduce the binding of a radioligand by 50%. This enabled the determination of  $K_i$  values (Table 2) (Cheng and Prusoff 1973), which are properties of the receptor and unlabeled ligand, whereas  $IC_{50}$  values are only properties of the experiment. The cytokinin binding strengths of all five receptors declined in the order  $tZ > iP > cZ$ . PCHK2 had a much higher sensitivity than the other four receptors; it displayed the lowest overall  $K_i$  values (the highest being 100 nM) and thus the strongest binding to cytokinin bases and ribosides. The only exception was  $tZR$ , which was bound slightly more strongly by the PCHK3a/b isoforms. However, PCHK3a and PCHK3b exhibit weaker binding to iP-type cytokinins,  $cZ$ , BAP, and  $oT$  than the other HKs. The  $K_i$  values for isoprenoid cytokinin bases range from 2 nM (for  $tZ$ ) to 1.1  $\mu$ M (for  $cZ$ ), while those for isoprenoid cytokinin ribosides range from 9 nM (for  $tZR$ ) to 2.3  $\mu$ M (for iPR). In general,  $tZR$  is a good ligand for all five PCHKs, with  $K_i$  values up to 50 nM, while iPR only binds strongly to PCHK2.

#### ***Binding of cytokinin ribosides to poplar HKs in live cell assay***

The fact that cytokinin ribosides can bind to receptors in *E. coli* assays was further verified by measuring binding stability. *E. coli* cultures expressing PCHK2, PCHK3b and PCHK4a were incubated with iPR for two hours at 4 °C compared with the standard 30 minutes. iPR incubated for 30 min was used as a positive control. Ligand concentrations were chosen to reach 50% [ $^3$ H]- $tZ$  displacement according to  $K_i$  values for iPR (25, 900 and 125 nM, Table 2). Obtained data (Fig. 5a) show that receptor saturation was ~ 50% and did not significantly differ over the incubation period. An addition of ZmNRH2b (Kopečná et al., 2013) induced release of iPR from iPR resulting in higher receptor saturation.

Additional UHPLC-MS/MS quantification of iPR and iPR incubated at 125 nM ( $K_i$  values for iPR) for 30 minutes in media containing *E. coli* producing PCHK4a was performed to assess a false positive effect of iPR released from iPR (Fig. 5b). A small conversion of iPR to iPR was observed (7.1 nM of 125 nM). Such a concentration of iPR would saturate the receptor only up to ~ 17 % (83% of nondisplaced tritiated  $tZ$ ) as calculated from the binding curve of iPR (Fig. 5c). However, the assay with 125 nM iPR (Fig. 5a, second column) showed saturation of  $49.7 \pm 3.4\%$ , which must be due to riboside binding. Addition of ZmNRH2b and 30-minute incubation at room temperature resulted in 50% conversion of iPR to iPR (58.0 nM). This concentration of iPR would saturate the receptor up to ~ 60 % according to the iPR binding curve. We may assume that  $65 \pm 1.9\%$  PCHK4a receptor saturation (Fig. 5a, last column) can be fully attributed to released iPR.

#### ***Binding of urea-derived and aromatic cytokinins***

The synthetic phenylurea TDZ (Mok et al. 1982) is a similarly good ligand to  $tZ$ , with low  $K_i$  values (Table 2). Two other TDZ derivatives, namely 1-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-3-(3-trifluoromethoxy-phenyl)urea (3FMTDZ) and 1-[2-(2-hydroxy-ethyl)phenyl]-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea (HETDZ) were also tested because they are better inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) (Nisler et al. 2016) than TDZ itself. As subtle modulations of cytokinin levels *in planta* can have positive effects on seed filling and crop yield, it is important to determine whether these new inhibitors can trigger undesired cytokinin signaling. 3FMTDZ and HETDZ are poor ligands for PCHK2, PCHK4a/b and PCHK3a. However, their affinity towards PCHK3b is higher, with  $K_i$  values of 0.6  $\mu$ M and 1.2  $\mu$ M, respectively. These values are comparable to the inhibition constants for CKX.

Of the tested aromatic cytokinin bases, BAP and  $mT$  bind to PCHKs with  $K_i$  values between ~23 nM and ~ 0.85  $\mu$ M (Table 2), with  $mT$  generally binding more strongly. Conversely,  $oT$  is a poor ligand for PCHK3 isoforms; its  $K_i$  values were above the range measurable in the assay. Leaves of mature *P. × canadensis* trees exhibit diurnally fluctuating levels of  $oT$  under physiological conditions (Jaworek et al. 2019); its concentration can peak at around 250 nM, which may be sufficient to trigger cytokinin signaling in poplar by activating PCHK2 and (at least partially) PCHK4b. This point was clarified by analyzing the expression of two cytokinin primary fast response genes coding for A-type RRs (Ramírez-Carvajal et al. 2008), namely *PcRR1* and *PcRR10*, by qPCR using FAM-TAMRA probes. *PcRR1* gene is strongly (~7 - 9 fold) upregulated while *PcRR10* gene response is only moderate (~ 3 fold) after  $tZ$  treatment for 4 hours

(Fig. S3). BAP, which displays much lower  $K_i$  values for all five receptors than *oT*, induces expression of *PcRR1* only, although it is still half of that observed with *tZ*. Activation of cytokinin signaling by *oT* and *oTR* (transport form of *oT*) is inconclusive as only two out of eleven type-A *RRs* were studied and differences in expression are not statistically significant enough.

### ***Cytokinin content in poplar leaves***

Finally, we profiled cytokinins in mature leaves of *P. × canadensis* between the end of May and September in 2017. (Fig. 6). As we had detected *oT* and *oTR* in poplar leaves harvested in July 2015 (Jaworek et al. 2019), here we screened their appearance covering the period of dark green fully expanded leaves till the early stage of senescence. Surprisingly, the levels of aromatic cytokinins were close to the detection limit (*oT*) or well below those required for appreciable receptor binding (*oTR*), and are not presented. The main isoprenoid cytokinin was *tZ* followed by *iP*, whereas the concentration of *cZ* was lower by one order of magnitude than that of *tZ*. Nevertheless, a decrease of total cytokinins was not observed during our experiment. While the levels of *tZ* and *cZ* steadily rose from the beginning of August till the end September, those of the remaining cytokinins did not follow any obvious trend (Fig. S4). *iP* and *iPR* displayed a positive peak during August.

### **Discussion**

The poplar genome contains five putative cytokinin receptor *HK* genes and to get insight into the cytokinin perception, we cloned all five *HKs* and analyzed gene expression and binding properties of coded receptor proteins. The data of *HK* gene expression correlate well with those in the apple tree (*Malus domestica*; *MdHK*) published only recently (Daudu et al. 2017). *MdHK2*, an orthologue of *PcHK2*, was the most abundant in leaves and stems; *MdHK3a* was mainly expressed in roots, and *MdHK3b* in flowers. In *Arabidopsis*, *AHK2* was reported to be moderately expressed in all tested organs, whereas *AHK3* transcripts were even more abundant in leaves and *AHK4* transcripts appeared mainly in roots (Ueguchi et al. 2001; Higuchi et al. 2004).

The  $K_D$  values for *tZ* and five poplar *PcHKs* in low nanomolar range observed in this work correlate well with those reported for *Arabidopsis* (Romanov et al. 2005, 2006; Stolz et al. 2011; Lomin et al. 2015), *Brassica* (Kuderová et al. 2015), and potato *HKs* (Lomin et al. 2018). The specificity and sensitivity of *PcHK2* are strikingly similar to those for the two orthologous receptors from *Brassica* (Kuderová et al. 2015). The high sensitivity of *PcHK2* parallels that of *MdHK2* from apple tree (Daudu et al. 2017). Similarly, the weak binding of *iP*-type cytokinins by *PcHK3a/b* is mirrored by that of the *Arabidopsis* *AHK3* receptor (Romanov et al. 2006) and to lesser degree by the *AHK3*-like *Brassica* *BnHK5* receptor (Kuderová et al. 2015). Both of these receptors also display similar specificity as *PcHK3a* and *PcHK3b*. Our experiments also confirmed that cytokinins bind to all five poplar receptors at pH values of their supposed subcellular localization either in endoplasmic reticulum (neutral pH, Martinière et al. 2013) or in apoplast (acidic pH of ~ 5.5) (Fig. 3b). At pH 5.5, both *PcHK4* receptors display maximal ligand-binding ability while *PcHK2* and both *PcHK3* receptors have their pH maxima at more neutral or basic pH values.

A superposition of the sensor domain of *Arabidopsis* *AHK4* (Hothorn et al. 2011) with those of five *PcHK* models constructed using SWISS-MODEL (Waterhouse et al. 2018) confirmed the presence of highly conserved and mainly hydrophobic residues that form the cytokinin binding cavity and are thus essential for receptor activity. The conservation of these residues is also apparent in the analysis of 52 plant *HKs* (Fig. 7a). All five *PcHKs* share a conserved aspartate residue (Asp285 in *AHK4*) that forms two hydrogen bonds to the nitrogen atoms of the cytokinin ligands' adenine ring, and a conserved threonine residue (Thr317 in *AHK4*) that binds the hydroxyl group of *tZ* (Fig. 7b-d). While T317A mutant was still binding *tZ*, residues interacting with the adenine ring (namely D285, F304, L306 and L307) were found to be essential for cytokinin binding because the corresponding alanine mutants were inactive (Hothorn et al. 2011).

The primary sphere of interactions of *PcHK4a* and *PcHK4b* with the cytokinin ligand comprises only a minor difference compared with that of *AHK4* where L274 is replaced by isoleucine in *PcHK4a/b* (Fig. 7b).

The substitution occurs above the cytokinin adenine ring. PcHK2 also exhibits this substitution of L274 for isoleucine, together with the replacement of Y273 with histidine and A345 with serine (Fig. 7d). The latter change introduces a new H-bond donor/acceptor at the base of the binding site, enabling stronger interactions with the cytokinin base's nitrogen atoms or the hydroxyl groups of a cytokinin riboside, as demonstrated by the  $K_i$  values for the PcHK2 and PcHK4a/b isoforms. The binding sites of PcHK3a and PcHK3b differ from that of AHK4 by five substitutions (Fig. 7c). L274, located above the cytokinin adenine ring, is replaced by smaller valine residue. However, two residues below the adenine ring, namely V315 and A345, are replaced by bulkier isoleucine residues. These residues would clash with a cytokinin molecule bound in the position observed in AHK4 (Hothorn et al. 2011) and therefore presumably alter the binding position of the cytokinin ligand, shifting its adenine moiety up towards V141 (in the PcHK3a numbering). These changes clearly destabilize the binding of the studied cytokinins (Table 2). The weak binding of iP derivatives can be explained by the missing isoprenoid hydroxyl group, which allows *tZ* derivatives to establish H-bonds to T317 on the opposite side of the cavity and thus bind more strongly.

Although a crystal structure of cytokinin receptor in complex with cytokinin riboside is not available, an induced fit, rearrangement of the loop close to the nucleobase or eventually a nucleobase flip may occur. In the case of cytokinin oxidase/dehydrogenase, the adenine base of the ligand can be flipped by 180° around its longitudinal axis formed by the isoprenoid side chain as observed for *tZ* in WT-ZmCKO1 (Malito et al. 2004) and for iP in P427Q-ZmCKO1 (Kopečný et al. 2016). Such a flip in AHK is possible and opens a possibility for riboside binding. Previously, it was demonstrated that cytokinin ribosides are poor ligands in plant assays using microsomal fractions but not intact cells as used in *E. coli* assay (Lomin et al. 2015). This brings a possibility of contamination with cytosolic enzymes involved in cytokinin metabolism such as NRHs (Kopečná et al. 2013) or adenosine kinases (Schoor et al. 2001) and others. We analyzed the stability of iP in live cell *E. coli* assay and found no changes in signal during several hours (Fig. 5). However, all data during competition experiments are always acquired after 30 minute incubation at 4 °C. Moreover, our UHPLC-MS/MS data show the presence of only a small amount of iP released from iPR which is not sufficient to displace 50% of [<sup>3</sup>H]-*tZ* based on binding curves for iP. These findings confirm that all five poplar HKs bind cytokinin ribosides in live cell assay. In parallel, pure NRH2b (Kopečná et al. 2013) was added to the reactions with iPR to release its free base iP. Our data show that it would take up to 8 hours to fully convert iPR and reach the value of iP signal at 4 °C.

Incubation at room temperature resulted in approximately half-conversion of iPR (Fig 5b). The amount of iP released and the calculated displacement of [<sup>3</sup>H]-*tZ* correlate well with the measured response of PcHK4a (displacement of tritiated *tZ*, Fig. 5a and 5c). Our finding is further supported by a recent study showing the ability of cytokinin receptors to bind *N*9-substituted cytokinins fluorescently labelled with 7-nitrobenzofurazan group (Kubiasová et al. 2018). Such compounds cannot be hydrolyzed as NRHs require the presence of the ribose group and therefore these derivatives are suitable for *in vivo* labelling.

The functional analysis of the receptors (Table 2, Fig. 4) suggests that PcHK2 (and to lesser extent also PcHK4a and PcHK4b) are the most likely to be activated by *in vivo* concentrations of iP. At least partial activation may also be induced by iPR. The cytokinin exhibiting the most dramatic seasonal changes in poplar was *tZ* (Fig. 6), but its concentration remained above  $K_i$  values for all receptors, suggesting that it plays a central role in cytokinin signaling in poplar. The affinity of *tZR* towards the receptors is lower by approximately one order of magnitude. However, the *in vivo* concentrations of *tZR* are more stable than those of *tZ* and still sufficient to activate all receptors, at least partially. Conversely, the concentration of *cZ* was much lower than that of the other cytokinins, suggesting that it induces little activation, if any. Levels of isoprenoid and aromatic cytokinins measured from *P. × canadensis* leaves presented in this work and those gathered two years earlier from the same tree (Jaworek et al. 2019) reveal considerable variability between years, as well as seasonal fluctuations. This is consistent with a report on annual and seasonal fluctuations in *P. tremula* (Edlund et al. 2017) observed in three consecutive years. Other factors such as interactions with microbial pathogens or insects must also be accounted for. Activation of cytokinin signaling pathway by both cytokinin types was verified by analyzing the expression of two A-type *RRs*, which are well known as fast

cytokinin response genes. Cytokinin-dependent upregulation of *RR1* and weaker activation of *RR10* was observed, which slightly differs from findings in *P. trichocarpa* (Ramírez-Carjaval et al. 2008) where stronger activation was reported for *RR10* using semi-quantitative PCR.

PcHK3b displays a significant constitutive background HK activity. The sequence shows no alternations in proximity to the conserved His site (SHE motif) found in the HK domain and conserved Asp site (FMD motif) in the receiver domain. Very recently, the similar activity was reported for both HK3a and HK3b in a study on apple MdHK family (Daudu et al. 2017), which relied on complementation of  $\Delta sln1$  yeast mutant strain lacking endogenous osmo-sensing HK called SLN1 (Inoue et al 2001). While MdHK2, MdHK4a and MdHK4b rescued the mutant in cytokinin-dependent manner, both MdHK3a and especially MdHK3b allowed a basal growth of the mutant in absence of cytokinin suggesting a constitutive background HK activity. Similar finding has also been reported for *A. thaliana* AHK3 and AHK2 (Tran et al. 2007). AHK4 variants equivalent to *rock2* and *rock3* mutants also suppressed the lethality of  $\Delta sln1$  even without the addition of cytokinin (Bartrina et al. 2017). Additionally, it is known that among five apple cytokinin receptors only MdHK3a and MdHK3b do not form homodimers (Daudu et al. 2017). Taken together, the constitutive HK activity of HK3 found in woody plants raises the question of either additional sensing function or alternation of kinase activity due to presence of particular unknown residue and slight structural rearrangements in relation to changes in the receptor's oligomerization.

## Conclusion

We have characterized all five poplar CHASE-containing HKs and verified that they function as genuine cytokinin receptors. The affinity of PcHK2 for cytokinins declines in the order  $tZ > TDZ > iP > iPR \geq mT \geq tZR > BAP > cZ > oT > oTR$ , whereas the cytokinin affinities of PcHK3a and PcHK3b decline in the order  $tZ > TDZ > tZR > mT > iP > BAP > cZ \sim iPR > oT > oTR$ . Those of PcHK4a and PcHK4b decline in the order  $tZ > iP \sim TDZ > tZR > iPR > mT \sim cZ > BAP > oT > oTR$ . Although the *PcHK2* and *PcHK3b* genes are expressed quite strongly across various organs in poplar, they have comparatively low kinase activation ratios. Conversely, the kinase activity of PcHK4a increases over 400-fold upon cytokinin binding, suggesting an exceptional role in strong responses to changes in cytokinin levels. The best receptor for aromatic cytokinins is PcHK2, which also displays a strong affinity for the other tested cytokinins. The full set of poplar HK constructs developed in this work could be used as a tool for testing newly developed urea derivatives as CKX inhibitors in order to identify compounds with strong inhibitory effects that do not activate cytokinin receptors. Such compounds have potential agricultural applications as agents for increasing crop yields (Kopečný et al. 2010; Nisler et al. 2016). It is important to note that cytokinin profiling was performed at the leaf level. Therefore, the quantitative data presented here relate to average cytokinin concentrations in the organs. Future studies should investigate the localization of cytokinin signaling at the sub-organ level.

## Contributions

D.K. and P.T. designed the research; P.J., T.H. and D.K. performed cloning; P.J. performed qPCR and binding assays; J.N. synthesized TDZ derivatives; Š.K and P.T. measured cytokinin levels in poplar; O.V. and P.T. measured cytokinins in *E. coli*; D.K. and P.J. wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported by the grant 15-16888S from the Czech Science Foundation, institutional support MZE-RO0418 and IGA\_PrF\_2018\_033 (Palacký University, Olomouc, CZ). D.K. and P.T. were supported also from ERDF project “Plants as a tool for sustainable global development” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000827). We acknowledge Zuzana Pěkná and Lukáš Spíchal for their help with the live cell competitive binding assay (Palacký University, Olomouc, CZ) and prof. Peter Hedden for proofreading the manuscript. Poplar calli were derived from dormant leaf buds provided by Dr. Jana Malá

from Forestry and Game Management Research Institute (Jíloviště, CZ). The pINI $\Delta$ EH vector and *E. coli* strain KMI001 were kindly provided by Dr. Zalabák (Palacký University, Olomouc, CZ). The authors are grateful to Sees-editing Ltd. (UK) for editing the manuscript. *Populus deltoides* sequence data were produced by the US Department of Energy Joint Genome Institute <http://www.jgi.doe.gov>.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

#### Appendix A. Supplementary data

The following supplemental materials are available online:

**Table S1** Primer pairs used for cloning of poplar *HKs* and housekeeping genes together with probes and primer pairs used for RT-qPCR of *PcHK* gene expression

**Table S2** Identities and similarities of amino acid sequences of the *HKs* from *P. × canadensis* with those from *P. trichocarpa* and *P. deltoides*

**Table S3** Number and position of transmembrane (TM) helical segments in poplar cytokinin receptors

**Table S4** Absolute quantification of *PcHK* transcripts

**Fig. S1** Gene models showing length of exons and introns of individual *HK* homologues

**Fig. S2** Relative background kinase activity of the receptors in the absence of cytokinin

**Fig. S3** Relative gene expression of *PcRRI* and *PcRRI0* upon cytokinin treatment

**Fig. S4** Concentration of isoprenoid cytokinins *tZ*, *cZ*, *iP* in samples of *P. × canadensis* leaves.

#### REFERENCES

- Bar M, Israeli A, Levy M, et al (2016) CLAUSA is a MYB transcription factor that promotes leaf differentiation by attenuating cytokinin signaling. *Plant Cell* 28:1602–1615. doi: 10.1105/tpc.16.00211
- Bartrina I, Jensen H, Novák O, et al (2017) Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant Physiol* 173:1783–1797. doi: 10.1104/pp.16.01903
- Beveridge CA, Murfet IC, Kerhoas L, et al (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *Plant J* 11:339–345. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11020339.x
- Caesar K, Thamm AMK, Witthöft J, et al (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J Exp Bot* 62:5571–5580. doi: 10.1093/jxb/err238
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099–3108



- Choi J, Lee J, Kim K, et al (2012) Functional identification of OsHk6 as a homotypic cytokinin receptor in rice with preferential affinity for iP. *Plant Cell Physiol* 53:1334–1343. doi: 10.1093/pcp/pcs079
- Corbesier L, Prinsen E, Jacquard A, et al (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J Exp Bot* 54:2511–2517. doi: 10.1093/jxb/erg276
- D’Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* 124: 1706–1717. doi: 10.1104/pp.124.4.1706
- Daudu D, Allion E, Liesecke F, et al (2017) CHASE-containing histidine kinase receptors in apple tree: from a common receptor structure to divergent cytokinin binding properties and specific functions. *Front Plant Sci* 8:1614. doi: 10.3389/fpls.2017.01614
- Dobránszki J, Mendler-Drienyovszki N (2014) Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves. *J Plant Physiol.* 171:1472-1478. doi: 10.1016/j.jplph.2014.06.015
- Dortay H, Mehnert N, Bürkle L, et al (2006) Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* 273:4631–4644. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05467.x
- Du L, Jiao F, Chu J, et al (2007) The two-component signal system in rice (*Oryza sativa* L.): a genome-wide study of cytokinin signal perception and transduction. *Genomics* 89:697–707. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.02.001
- Edlund E, Novak O, Karady M, et al (2017) Contrasting patterns of cytokinins between years in senescing aspen leaves. *Plant Cell Environ* 40:622–634. doi: 10.1111/pce.12899
- Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, et al (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Hewett EW, Wareing PF (1973) Cytokinins in *Populus x robusta* (schneid): light effects on endogenous levels. *Planta* 114:119–129. doi: 10.1007/BF00387470
- Heyl A, Wulfetange K, Pils B, et al (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol Biol* 7:62. doi: 10.1186/1471-2148-7-62
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, et al (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci* 101:8821–8826. doi: 10.1073/pnas.0402887101
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, et al (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* 59:75–83. doi: 10.1093/jxb/erm157
- Horgan R, Hewett EW, Purse JG, Wareing PF (1973) A new cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron Lett* 14:2827–2828. doi: 10.1016/S0040-4039(01)96062-9
- Hothorn M, Dabi T, Chory J (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat Chem Biol* 7:766–768. doi: 10.1038/nchembio.667
- Huang X, Miller W (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv Appl Math* 12:337–357. doi: 10.1016/0196-8858(91)90017-D
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413:383–389. doi: 10.1038/35096500
- Immanen J, Nieminen K, Silva HD, et al (2013) Characterization of cytokinin signaling and homeostasis gene families in two hardwood tree species: *Populus trichocarpa* and *Prunus persica*. *BMC Genomics* 14:885. doi: 10.1186/1471-2164-14-885
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, et al (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409:1060–1063. doi: 10.1038/35059117
- Jaworek P, Kopečný D, Zalabák D, et al (2019) Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta* 250:229–244. doi: 10.1007/s00425-019-03152-z

- Kieber JJ, Schaller GE (2014) Cytokinins. Arab Book e0168. doi: 10.1199/tab.0168
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, et al (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci 103:814–819. doi: 10.1073/pnas.0505150103
- Kopečná M, Blaschke H, Kopečný D, et al (2013) Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. Plant Physiol 163:1568–1583. doi: 10.1104/pp.113.228775
- Kopečný D, Briozzo P, Popelková H, et al (2010) Phenyl- and benzylurea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: a structural study. Biochimie 92:1052–1062. doi: 10.1016/j.biochi.2010.05.006
- Kopečný D, Končítíková R, Popelka H et al (2016) Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. FEBS J. 283: 361-77. doi: 10.1111/febs.13581
- Kubiasová K, Mik V, Nisler J et al (2018) Design, synthesis and perception of fluorescently labeled isoprenoid cytokinins. Phytochemistry 150: 1-11. doi: 10.1016/j.phytochem.2018.02.015
- Kuderoová A, Gallová L, Kuricová K, et al (2015) Identification of AHK2- and AHK3-like cytokinin receptors in *Brassica napus* reveals two subfamilies of AHK2 orthologues. J Exp Bot 66:339–353. doi: 10.1093/jxb/eru422
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MY, et al (2015) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. J Exp Bot 66:1851–1863. doi: 10.1093/jxb/eru522
- Lomin SN, Myakushina YA, Kolachevskaya OO, et al (2018) Cytokinin perception in potato: new features of canonical players. J Exp Bot 69:3839–3853. doi: 10.1093/jxb/ery199
- Lomin SN, Yonekura-Sakakibara K, Romanov GA, Sakakibara H (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. J Exp Bot 62:5149–5159. doi: 10.1093/jxb/err220
- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, et al (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. Genes Dev 14:2938–2943
- Malito E, Coda A, Bilyeu KD, Fraaije MW, Mattevi A (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. J Mol Biol 341: 1237-49. doi: 10.1016/j.jmb.2004.06.083
- Martinière A, Bassil E, Jublanc E, et al (2013) In vivo intracellular pH measurements in tobacco and *Arabidopsis* reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. Plant Cell 25:4028-43. doi: 10.1105/tpc.113.116897.
- Miwa K, Ishikawa K, Terada K, et al (2007) Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. Plant Cell Physiol 48:1809–1814. doi: 10.1093/pcp/pcm145
- Mok DW, Mok and MC (2001) Cytokinin metabolism and action. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52:89–118. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.89
- Mok MC, Mok DWS, Armstrong DJ, et al (1982) Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). Phytochemistry 21:1509–1511. doi: 10.1016/S0031-9422(82)85007-3
- Müller B, Sheen J (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. Nature 453:1094–1097. doi: 10.1038/nature06943
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, et al (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. Plant Cell 16:1365–1377. doi: 10.1105/tpc.021477
- Nisler J, Kopečný D, Končítíková R, et al (2016) Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase. Plant Mol Biol 92:235–248. doi: 10.1007/s11103-016-0509-0

- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217. doi: 10.1006/jmbi.2000.4042
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, et al (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69:2214–2224. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.04.022
- Pils B, Heyl A (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiol* 151: 782–91. doi: 10.1104/pp.109.139188
- Ramírez-Carvajal GA, Morse AM, Davis JM (2008) Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development. *New Phytol* 177:77–89. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02240.x
- Rashotte AM, Carson SD, To JP, Kieber JJ (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1998–2011. doi: 10.1104/pp.103.021436
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmülling T (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18:40–54. doi: 10.1105/tpc.105.037796
- Rittenberg D, Foster GL (1940) A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *J Biol Chem* 133:737–744
- Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot* 57:4051–4058. doi: 10.1093/jxb/erl179
- Romanov GA, Spíchal L, Lomin SN, et al (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Anal Biochem* 347:129–134. doi: 10.1016/j.ab.2005.09.012
- Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 51:660–672. doi: 10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x
- Schoor S, Farrow S, Blaschke H et al (2011) Adenosine kinase contributes to cytokinin interconversion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 157:659–72. doi: 10.1104/pp.111.181560
- Sorrentino G, Haworth M, Wahbi S, et al (2016) Abscisic acid induces rapid reductions in mesophyll conductance to carbon dioxide. *PLOS ONE* 11:e0148554. doi: 10.1371/journal.pone.0148554
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, et al (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* 45:1299–1305. doi: 10.1093/pcp/pch132
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, et al (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J* 67:157–168. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04584.x
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* 101:674–688. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x
- Strnad M, Hanus J., Vanek T., et al (1997) *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry* 45:213–218. doi: 10.1016/S0031-9422(96)00816-3
- Strnad M, Peters W, Beck E, Kamínek M (1992) Immunodetection and identification of N6-(*o*-hydroxybenzylamino)purine as a naturally occurring cytokinin in *Populus x canadensis* Moench cv *Robusta* leaves. *Plant Physiol* 99:74–80
- Strnad M, Peters W, Hanuš J, Beck E (1994) *Ortho*-topolin-9-glucoside, an aromatic cytokinin from *Populus x canadensis* cv *Robusta* leaves. *Phytochemistry* 37:1059–1062. doi: 10.1016/S0031-9422(00)89528-X
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, et al (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* 42:107–113. doi: 10.1093/pcp/pce037

- Takeda S, Fujisawa Y, Matsubara M, et al (2001) A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC → YojN → RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol Microbiol* 40:440–450. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02393.x
- Tirichine L, Sandal N, Madsen LH, et al (2007) A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* 315:104–107. doi: 10.1126/science.1132397
- To JP, Haberer G, Ferreira FJ et al (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* 16: 658-671. doi: 10.1105/tpc.018978
- Tran LSP, Urao T, Qin F, et al (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20623–20628. doi: 10.1073/pnas.0706547105
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, et al (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313:1596–1604. doi: 10.1126/science.1128691
- Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 42:231–235. doi: 10.1093/pcp/pce015
- Wang F-F, Cheng S-T, Wu Y, et al (2017) A bacterial receptor PcrK senses the plant hormone cytokinin to promote adaptation to oxidative stress. *Cell Rep* 21:2940–2951. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.017
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46:W296–W303. doi: 10.1093/nar/gky427
- Werner T, Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 12:527–538. doi: 10.1016/j.pbi.2009.07.002
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, et al (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* 156:1808–1818. doi: 10.1104/pp.111.180539
- Yamada H, Suzuki T, Terada K, et al (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol* 42:1017–1023
- Yonekura-Sakakibara K, Kojima M, Yamaya T, Sakakibara H (2004) Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. *Plant Physiol* 134:1654–1661. doi: 10.1104/pp.103.037176

## TABLES

**Table 1** A nomenclature of HKs from *P. × canadensis* (cv. *Robusta*) studied in this work. The table shows GenBank™ accession numbers for all five *HK* genes as well as Phytozome ID numbers for the respective *P. trichocarpa* orthologues with their chromosome locations and corresponding amino acid lengths. Sequence identities of CHASE domains with either those of their *A. thaliana* orthologues or only that of AHK4 with known crystal structure (Hothorn et al. 2011) were calculated by Lalign (Huang and Miller 1991)

Gene name	GenBank™ accession	Phytozome ID ( <i>P. trichocarpa</i> )	Chromosome #	AA	Identity of CHASE domain to:	
					<i>A.th.</i> ortholog (%)	AHK4 (%)
<i>PcHK2</i>	MH248795	Potri.014G164700	14	1261	80.3	63.6
<i>PcHK3a</i>	MH248793	Potri.001G057400	1	1020	84.8	61.7
<i>PcHK3b</i>	MH248794	Potri.003G171000	3	1019	84.8	62.5
<i>PcHK4a</i>	MH248791	Potri.008G137900	8	1006	82.6	82.6
<i>PcHK4b</i>	MH248792	Potri.010G102900	10	1006	82.6	82.6

**Table 2**  $K_i$  values for various natural and synthetic cytokinins and their binding to the cytokinin HK receptors from poplar. The values were calculated using the equation of Cheng and Prusoff (Cheng and Prusoff 1973) based on  $IC_{50}$  values obtained from competitive binding curves and the known  $K_D$  values for  $[3H]$ -*tZ* towards each receptor determined at pH 7.0. Values are means of at least three measurements

Compound	$K_i$ (nM)				
	PcHK2	PcHK3a	PcHK3b	PcHK4a	PcHK4b
iP	3.9 ± 0.2	236 ± 13	147 ± 13	17 ± 0.9	14 ± 1
<i>tZ</i>	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.8 ± 0.2
<i>cZ</i>	106 ± 7	858 ± 113	1070 ± 194	205 ± 24	331 ± 22
iPR	22 ± 1	2270 ± 117	890 ± 81	125 ± 6	96 ± 11
<i>tZR</i>	24 ± 2	8.9 ± 0.8	11 ± 0.4	38 ± 3	53 ± 2.1
BAP	87 ± 5	704 ± 33	850 ± 82	601 ± 27	739 ± 39
<i>oT</i>	1100 ± 118	>5000	>5000	4500 ± 296	2820 ± 346
<i>mT</i>	23 ± 2	55 ± 6	52 ± 5	302 ± 22	223 ± 16
TDZ	2.2 ± 0.1	3.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	9.6 ± 0.5	23 ± 1
HETDZ	>5000	3530 ± 789	1190 ± 88	>5000	>5000
3FMTDZ	>5000	3890 ± 465	622 ± 37	>5000	>5000

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1** Phylogenetic tree illustrating the relationship of poplar PcHK2, PcHK3a/b and PcHK4a/b to other CHASE-containing HKs. Amino acid alignments of 28 HKs were performed using T-Coffee (Notredame et al. 2000) and treated with Gblocks (Castresana 2000). The maximum likelihood phylogeny with bootstrap analysis was performed with PhyML v3.0 using the LG amino acid replacement matrix (Guindon et al. 2010). The internal labels show bootstrap frequencies (in percentage) for each clade. Scale bar shows an average number of substitutions per site. Only a subset of known HKs was chosen, focusing on those that have been studied previously. The subset includes examples from *Arabidopsis thaliana* (AtHKs: At5g35750, At1g27320 and At2g01830), *Brassica napus* (BnHKs: KF621029-33), *Malus domestica* (MdHKs: KM114879-83), *Oryza sativa* (OsHKs: Os02g50480, Os03g50860, Os10g21810 and Os01g69920), *Solanum tuberosum* (StHKs: XM\_015303261.1, XM\_006352114.2 and XM\_006354988.2) and *Zea mays* (ZmHKs: AB042270, AB102956, AB102957 and AB121445)

**Fig. 2** Expression pattern of *PcHK* genes in various organs. The heat map shows transcript levels detected in 1 ng of total RNA. These total transcript levels are expressed as  $\log_2$ -values and are color-coded from blue to red representing the lowest and highest detected transcript numbers, respectively

**Fig. 3** Cytokinin binding and kinase activity of PcHKs. **a** Dose-dependent specific binding of [ $^3$ H]*tZ* to cytokinin receptor-expressing *E. coli* clones. Binding was studied at pH 7.0 and cytokinin concentrations of up to 30 nM, and the calculated  $K_D$  values are given for each receptor. **b** Effect of pH on binding strength. Binding was analyzed for [ $^3$ H]-*tZ* in pH range from 5.5 to 8.0 using 100 mM MES and MOPS buffers. **c** Ratios of maximal to background kinase activity for individual receptors. Maximal activity was measured in the presence of 1  $\mu$ M *tZ*. Absolute detected fluorescence values were normalized against the product of the bacterial cultures' OD<sub>600</sub> values and cultivation times (fluorescence  $\times$  OD<sub>600</sub><sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>). Two values were calculated for each receptor, representing results obtained in the absence and presence, respectively, of 1  $\mu$ M *tZ*: 358  $\pm$  16 and 2128  $\pm$  371 for PcHK2, 11  $\pm$  6 and 294  $\pm$  53 for PcHK3a, 3817  $\pm$  477 and 6522  $\pm$  515 for PcHK3b, 6  $\pm$  14 and 2795  $\pm$  83 for PcHK4a, 13  $\pm$  1 and 398  $\pm$  44 for PcHK4b. All measurements were performed twice with three technical replicates.

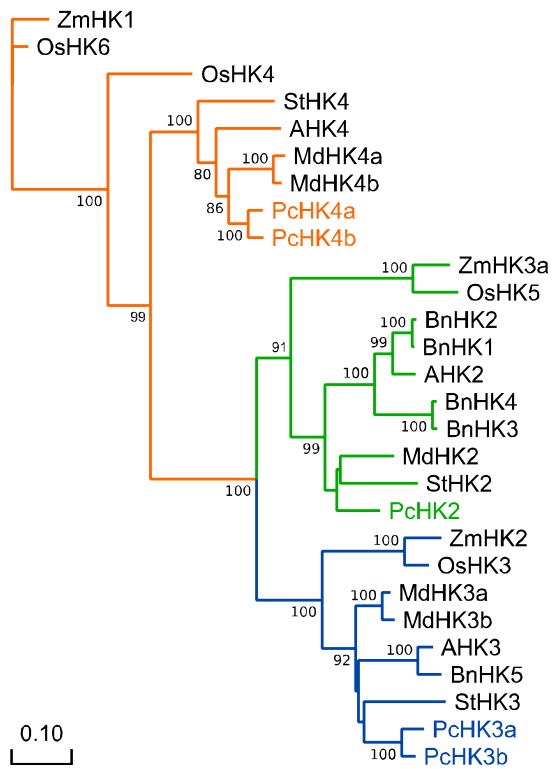
**Fig. 4** Competitive binding curves for various cytokinins versus [ $^3$ H]-*tZ* using five poplar cytokinin receptors. The bound radioactivity corresponding to 100% binding was 19500, 11000, 70000, 16500 and 13500 dpm for experiments with PcHK2, PcHK3a, PcHK3b, PcHK4a and PcHK4b, respectively. Binding was studied at pH 7.0.

**Fig. 5** Stability of iPR in cytokinin binding assays with three PcHKs. **a** The graph shows relative binding of cytokinin base (iP) and riboside (iPR) determined by competitive binding assay with [ $^3$ H]-*tZ* at pH 7.0. Concentrations of iP and iPR used in the assay were based on  $K_i$  values for each receptor (25 nM for PcHK2, 900 nM for PcHK3b and 125 nM for PcHK4a). Addition of nucleoside N-ribohydrolase (NRH), hydrolyzing ribosides to bases, to *E. coli* samples resulted in signal increase corresponding to stronger binding of iP. Dashed lines indicate a maximal response if all iPR would be converted to iP. **b** Concentration of iP and iPR present in the reaction mixture with PcHK4a receptor-expressing *E. coli* clones determined by UHPLC-MS/MS. Data show cytokinin levels under standard assay conditions and upon addition of NRH; applied 125 nM iPR incubated for 30 minute is shown as a dashed line. **c** Calculated saturation of the PcHK4a receptor by the amount of released iP from iPR as measured by UHPLC-MS/MS in the reaction mixture.

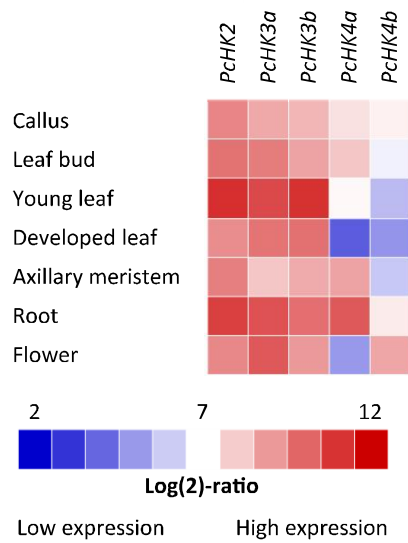
**Fig. 6** Seasonal fluctuations of isoprenoid cytokinins in leaves of *P.  $\times$  canadensis*. Values for each cytokinin represent a sum of 48 data points and concentrations are reported in units of nM although they were determined in pmol g<sup>-1</sup> FW. The conversion assumes a relative leaf water content of 95 % (1.0 g  $\sim$  0.95 ml).

Values in boxes cover data from upper and lower quartiles (25 – 75 %), lines in the middle of the boxes stand for a median value while the black squares indicate a mean values. Whiskers delineate 9<sup>th</sup> and 91<sup>st</sup> percentiles and stars indicate the lowest and highest values.

**Fig. 7** Amino acid conservation in the cytokinin binding sites of poplar HKs. **a** Overall conservation of residues forming cytokinin binding sites in 52 plant HKs. Sequence logos were generated using WebLogo (<http://weblogo.threeplusone.com>). 3D representations of the binding sites for the PcHK4a model (**b**, colored in pink), PcHK3a model (**c**, colored in blue), and PcHK2 model (**d**, colored in green) constructed using SWISS-MODEL with the crystal structure of *Arabidopsis* AHK4 (PDB ID 3T4L) serving as a template (colored in gray). The numbering follows that of AHK4; substitutions are labelled in red and indicated by red arrows.

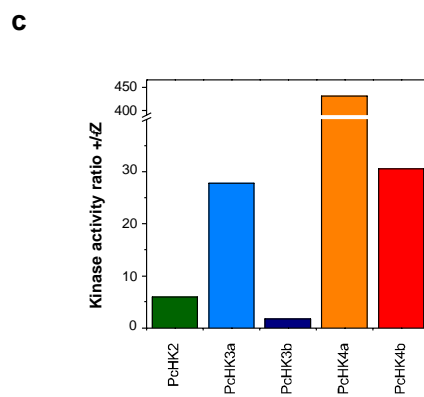
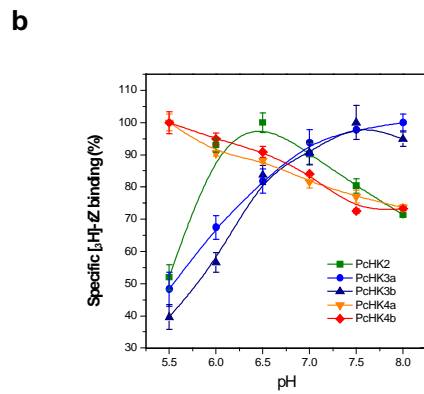
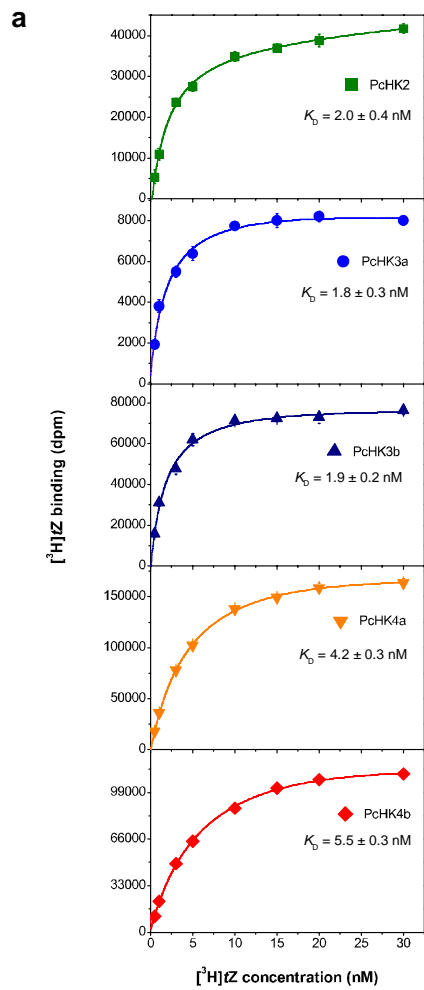


**Figure 1**

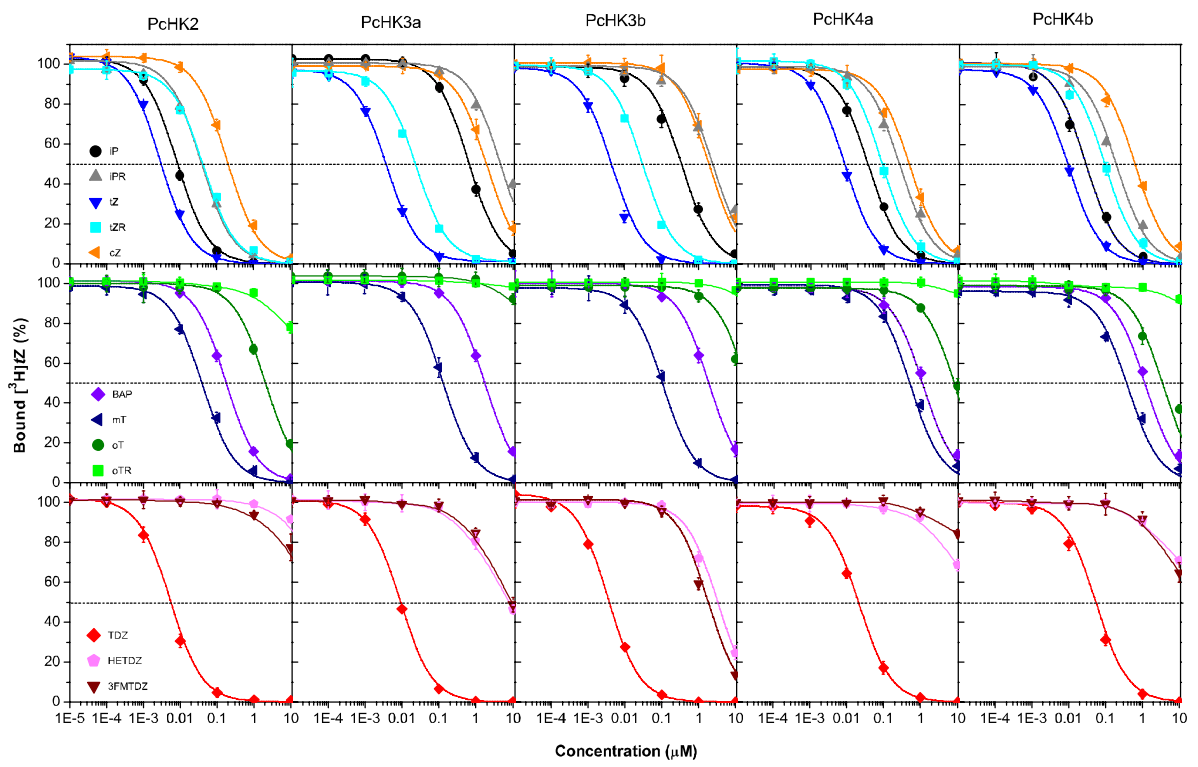


**Figure 2**

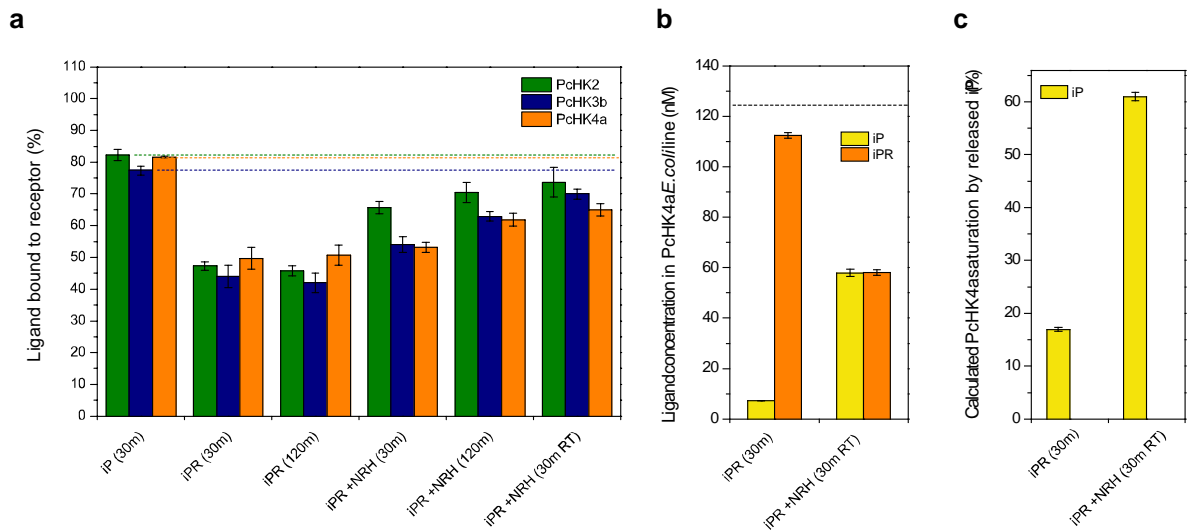




**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

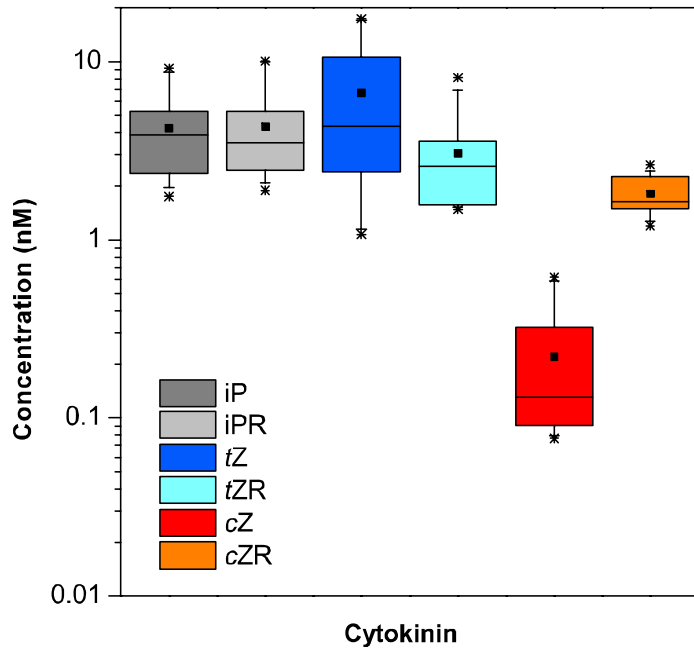


Figure 6

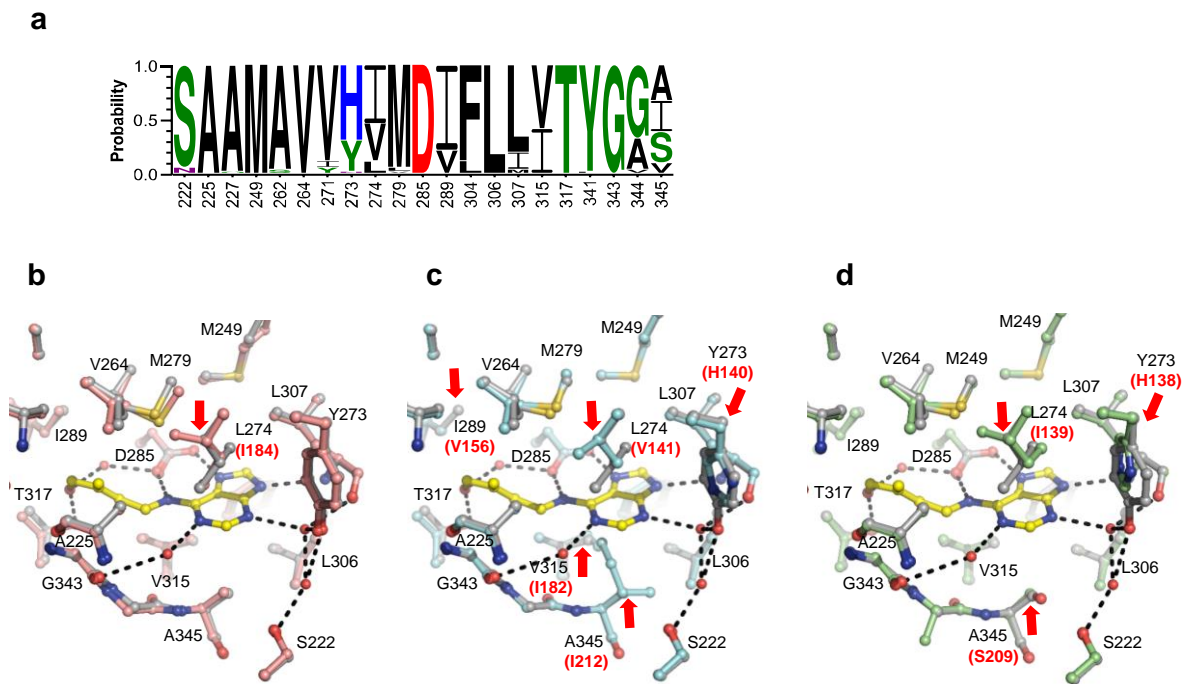


Figure 7

## Supplementary material

### **Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins**

Pavel Jaworek<sup>1,2</sup>, Petr Tarkowski<sup>1,3</sup>, Tomáš Hluska<sup>3</sup>, Štěpán Kouřil<sup>1</sup>, Ondřej Vrobel<sup>1,3</sup>, Jaroslav Nisler<sup>4</sup>, David Kopečný<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Phytochemistry and* <sup>2</sup>*Department of Protein Biochemistry and Proteomics, Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 27, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic*

<sup>3</sup>*Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 29, CZ-78371 Olomouc, Czech Republic*

<sup>4</sup>*Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany, AS CR & Palacký University, Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic*

\*Corresponding author

David Kopečný: david.kopecny@upol.cz; Tel.: +420 585634840, Fax: +420 585634933

**Table S1** Primer pair sequences used for cloning of poplar *HKs* and housekeeping genes and probes and primer pair sequences used for RT-qPCR determination of poplar *HK* and *RR* gene expression

<b>Oligo name</b>	<b>Oligo sequence (5' to 3')</b>
<b>Primer pair sequences for cloning into the Zero Blunt or pINIII vectors</b>	
PcHK2_Fw	ATGAGTTGTTACTGGTGGTGGAG
PcHK2_R	CTAAAAAAACCGTGTACAGCATTGTA
PcHK3a_Fw	ATGAGTTTACTTCATGTATATGGGTT
PcHK3a_R	CTATAAATTCACGTTGGACGTTGGCTGT
PcHK3b_Fw	ATGAGTTTGCTTCATGTATTTGG
PcHK3b_R	CTATAAATTCGCACTGGAAGTTG
PcHK4a_Fw	ATGGCGTTAAAGATGCAGCAAAGC
PcHK4a_R	TTATGACTTCAAAGTGGATTTGGTAT
PcHK4b_Fw	ATGGCGTTGAATATACAGCAAAGTTA
PcHK4b_R	TTATGACTTTAAAGTGGATTTGCTAT
PcHK4b_BamHI_Fw	ACTGGATCCGATTATGGCGTTGAATATACAGCA
PcHK4b_SpeI_R	TAGACTAGTTTATGACTTTAAAGTGGATTTG
UBQ1_Fw	ATGCAGATCTTTGTGAAAACCCCTGAC
UBQ1_R	TTGGCCTCAACTGGTTGCTGT
TUA2_Fw	CATACACATAGGGCAAGCAGGGATT
TUA2_R	GTCTTCTTCATCATCTACACCTTCA
<b>Probes and primer for RT-qPCR</b>	
PcHK2_qFw	CGCCATTTCAATGTCAGCAA
PcHK2_Probe	[6FAM]- ACCAGCTTCATGCTTTGGGTTCTTTGTTCT-[TAM]
PcHK2_qR	GGGATGCTACCTGATCTGAATCA
PcHK3a_qFw	GCTGCATCTTTACAACGAGCAAT
PcHK3a_Probe	[6FAM]- ATCCCCGCAATGGAGAACACCCC-[TAM]
PcHK3a_qR	AACAAGATGGTTGCAAAGAGACAA
PcHK3b_qFw	CCCAATGAATGGTGTCTTAGGA
PcHK3b_Probe	[6FAM]- ATGGACACAGAAGTAGACGCAACTCAGCAA-[TAM]
PcHK3b_qR	TTTATAAGTGAGACCAGTGCTTTTCC
PcHK4a_qFw	ACTTGTTTTAAATGGAGGATCCAATG
PcHK4a_Probe	[6FAM]- CTTACATCAGGTTCCCAAAA-[MGBNFQ]
PcHK4a_qR	TGCTTACAACCACTCAAGGTT
PcHK4b_qFw	TCACTGAAAGAGGACATACATTTCGTT
PcHK4b_Probe	[6FAM]- CCAAGGCCACGACAGATACAAAAGCAGAC-[TAM]
PcHK4b_qR	TATAAGCACACTTTCATTGGACCCA
RR1_qFw	TTCATCGCCGCCCTCTATC
RR1_Probe	[6FAM]ACCGTCTCCTTCGCCTTCCTCTGC[TAM]
RR1_qR	CGGCGCTGATGATGAGAAC
RR10_qFw	GCTCTGTTGGGTTCAATGATTTG
RR10_Probe	[6FAM]TCAATCTCATCATGACCGATTACTCCATGC[TAM]
RR10_qR	TTTTTAAGCAGCTCATATCCTGTCA
PcUBQ1_qFw	TCTTGAGGTCGAATCTAGTGATACTATTG
PcUBQ1_Probe	[6FAM]-CAATGTCAAAGCCAAAATCCAGGACAAGG-[TAM]
PcUBQ1_qR	CTCTGCTGATCAGGAGGAATCC
PcTUA2_qFw	CAATGCTTGTGGGAGCTTTACT
PcTUA2_Probe	[6FAM]-TCTTGAACATGGCATCCAGCCAGATG-[TAM]
PcTUA2_qR	TGAAGCGTCACTAGGCATCACT

**Table S2** Identities and similarities of amino acid sequences of the HKs from *P. × canadensis* with those from *P. trichocarpa* and *P. deltoides*

	<i>P. trichocarpa</i>		<i>P. deltoides</i>	
	Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	Similarity (%)
<b>PcHK2</b>	98.5	99.2	98.2	99.0
<b>PcHK3a</b>	99.4	99.7	100.0	100.0
<b>PcHK3b</b>	99.8	100.0	100.0	100.0
<b>PcHK4a</b>	99.2	99.8	99.1	99.8
<b>PcHK4b</b>	99.2	99.9	98.5	99.7

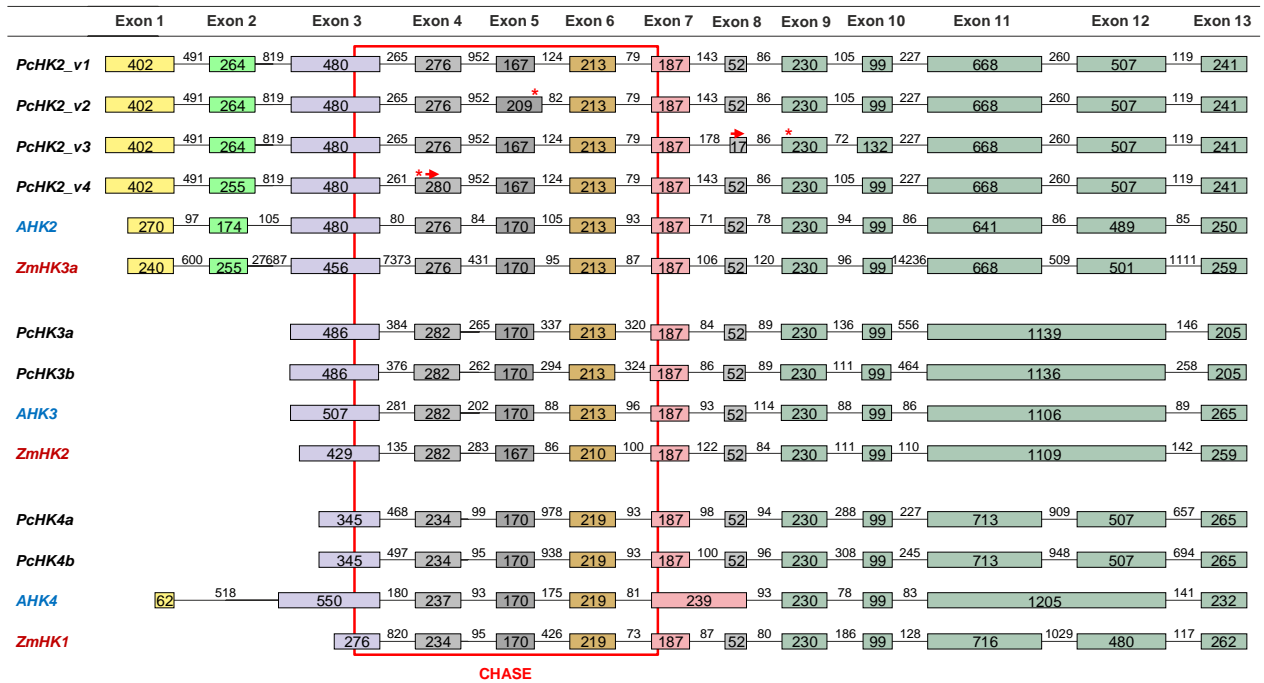
**Table S3** Number and position of transmembrane (TM) helical segments in poplar cytokinin receptors. Poplar sequences were analyzed using TMpred server TMHMM Server v. 2.0

Gene name	AA	TM segments (TMHMM)				TM segments (TMpred)			
		TM1	TM2	TM3	TM4	TM1	TM2	TM3	TM4
<i>PcHK2</i>	1261	68-87	245-262	308-325	-	68-86	244-266	308-325	611-630
<i>PcHK3a</i>	1020	13-35	88-106	391-413	-	15-34	88-106	393-414	-
<i>PcHK3b</i>	1019	15-34	88-106	391-413	-	13-34	89-107	393-414	-
<i>PcHK4a</i>	1006	41-60	338-360	-	-	37-57	324-353	-	-
<i>PcHK4b</i>	1006	41-60	331-353	-	-	37-57	324-353	-	-

**Table S4** Absolute quantification of *PcHK* gene expression. Results are given as number of gene copies per 1 ng of RNA in various plant organs of *P. × canadensis* determined by qPCR. Mean values with SD were calculated from samples (pooled plant material) transcribed in two independent reactions and each was measured in triplicate. PCR efficiencies and specificities of designed probes and primer pairs were verified using plasmid DNA carrying ORFs of the poplar *HK* genes. Cycle threshold values were normalized with respect to the amplification efficiency of two housekeeping genes *UBQ1* and *TUA2*.

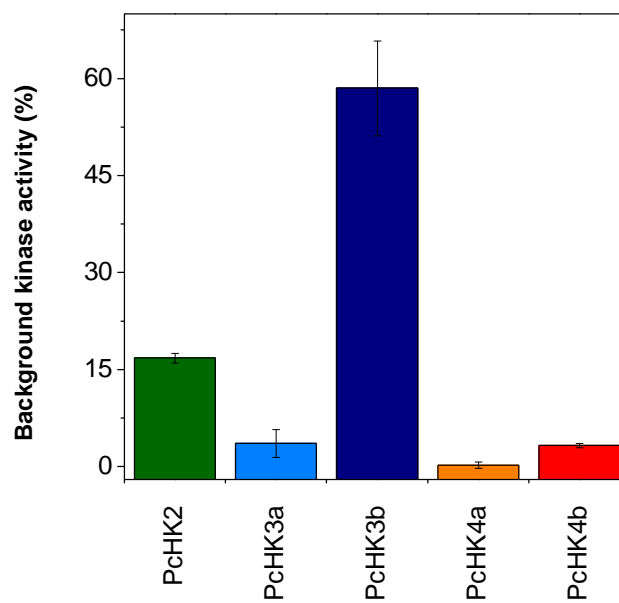
	<b>Callus</b>	<b>Leaf bud</b>	<b>Young leaf</b>	<b>Developed leaf</b>	<b>Axillary meristem</b>	<b>Root</b>	<b>Flower</b>
<i>PcHK2</i>	671 ± 205	865 ± 75	2176 ± 350	595 ± 42	728 ± 214	1697 ± 314	647 ± 210
<i>PcHK3a</i>	416 ± 104	758 ± 40	1512 ± 188	845 ± 78	279 ± 46	1344 ± 257	1232 ± 362
<i>PcHK3b</i>	348 ± 42	450 ± 43	2081 ± 318	889 ± 145	406 ± 46	904 ± 208	507 ± 136
<i>PcHK4a</i>	193 ± 20	277 ± 14	139 ± 31	14 ± 2	447 ± 53	1220 ± 275	32 ± 4
<i>PcHK4b</i>	153 ± 31	106 ± 7	51 ± 9	30 ± 18	61 ± 5	170 ± 36	425 ± 42

**Fig. S1** Gene models showing length (bp) of exons (boxes) and introns (lines) of individual *HK* homologues from *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* and *Populus × canadensis*. Models of *PcHK* genes were deduced from alignment with orthologues genes from *Populus trichocarpa*. *PcHK2* is present in several detected splicing variants, *PcHK2\_v1* represents the functional gene. Red rectangle flanks the CHASE domains, arrows and asterisks indicate the positions of insertion/deletion leading to frame shift and stop codon, respectively

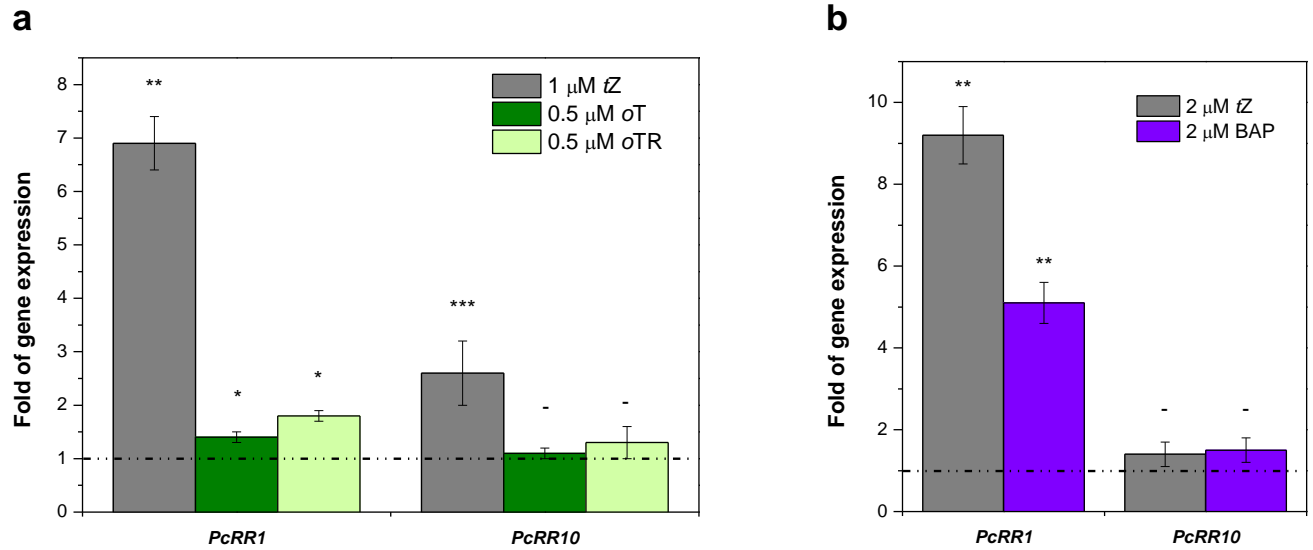




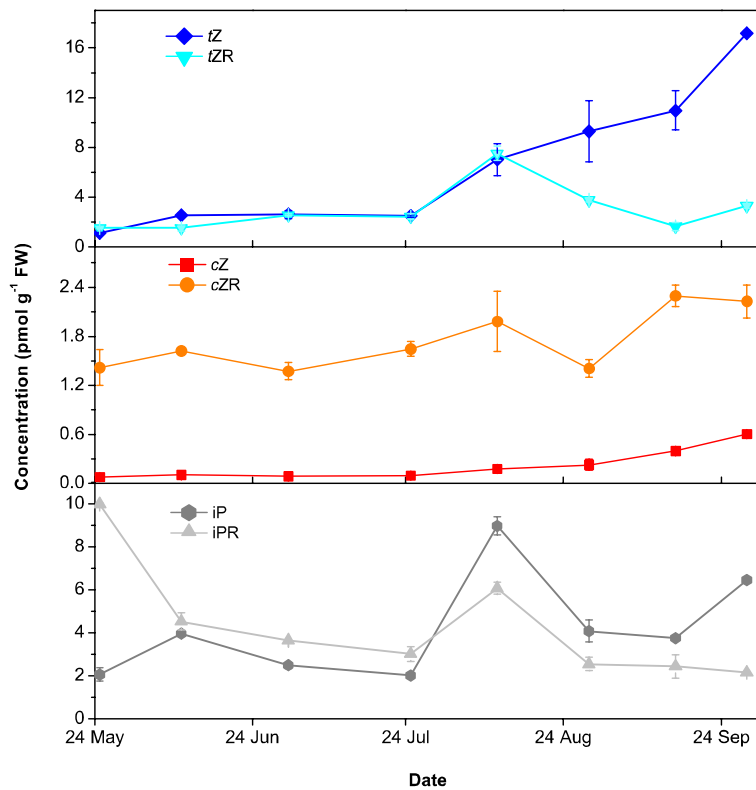
**Fig. S2** Relative background kinase activity of the receptors in the absence of cytokinin, calculated as the percentage ratio of background activity to maximal activity in the presence of 1  $\mu$ M *tZ*. Absolute detected fluorescence values were normalized against the product of the bacterial cultures'  $OD_{600}$  values and cultivation times (fluorescence  $\times OD_{600}^{-1} \times h^{-1}$ ). All measurements were performed twice with three technical replicates.



**Fig. S3** Relative gene expression of *PcRR1* and *PcRR10* upon cytokinin treatment. Total RNA was isolated from young leaves exposed to cytokinin stimuli for 4 hours (**a**), or young twigs exposed to cytokinins for 24 hours (**b**). Transcript abundance of both genes was determined by qPCR using FAM-TAMRA dual labelled probes and was further normalized against expression of the ubiquitin reference gene. Error bars were calculated from triplicates. Asterisks indicate statistically significant difference in the cytokinin treated versus non-treated samples in a Student's t-test (t-test; \*, \*\*, and \*\*\* correspond to P-values of  $0.05 > p > 0.01$ ,  $0.01 > p > 0.001$ , and  $p < 0.001$ , respectively).



**Fig. S4** Concentration of isoprenoid cytokinins *tZ*, *cZ*, *iP* in samples of *P. × canadensis* leaves. The values (in  $\text{pmol g}^{-1}$  fresh weight of leaf material) represent an average of two biological samples analyzed in triplicate. Error bars represent standard deviations.





**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta



**Autoreferát disertační práce**

**Biosyntéza a percepce cytokininů v topolu**

Mgr. Pavel Jaworek

P1416 Biochemie

Olomouc 2019

Disertace byla vypracována na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a na Oddělení fytochemie a Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum.

Disertant: **Mgr. Pavel Jaworek**

Školitel: **doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.**  
Oddělení fytochemie  
Univerzita Palackého v Olomouci, CR Haná

Odborný konzultant: **Mgr. David Kopečný, Ph.D.**  
Odd. biochemie proteinů a proteomiky  
Univerzita Palackého v Olomouci, CR Haná

Oponenti: **doc. RNDr. Jan Hejátko, Ph.D.**  
Funkční genomika a proteomika rostlin  
Masarykova Univerzita, CEITEC

**doc. RNDr. Radomíra Vaňková, CSc.**  
Laboratoř hormonálních regulací u rostlin  
Ústav experimentální botaniky AV ČR

## ABSTRAKT

Cytokinininy jsou skupinou fytohormonů klíčovou pro regulaci růstu a vývoje rostlin. Podle charakteru postranního řetězce, vázaného na exocyklický dusík adeninu, se dělí na isoprenoidní a vzácněji se vyskytující aromatické. Jako modelový organismus pro studium metabolismu a percepce aromatických cytokininů vybrán *Populus × canadensis* cv. *Robusta*. Tento topol obsahuje *ortho*-topolin a jeho ribosid, který je zároveň vázán v tRNA. Podařilo se klonovat geny všech devíti topolových isopentenyltransferas (*PcIPT*), které kódují enzymy katalyzující první krok biosyntézy isoprenoidních cytokininů, a také všech pěti histidinkinasových receptorů cytokininů (*PcHK*). Jejich genová exprese byla napříč orgány topolu analyzována pomocí kvantitativní PCR. Funkčnost většiny *PcIPT* *in vivo* byla prokázána indukovatelnou expresí příslušných genů v *Arabidopsis thaliana*. Transgenní linie produkovaly značná množství metabolitů isopentenyldeninu a *trans*-zeatinu, ale u některých byly překvapivě zaznamenány i zvýšené hladiny cytokininů *cis*-zeatinového typu. *PcHK* byly exprimovány v *Escherichia coli*, navazující „live cell binding assay“ umožnila stanovit ligandovou specifitu a pH optimum všech pěti rekombinantních proteinů. Většinu cytokininů během kompetičních testů vázala nejsilněji *PcHK2*. Dále byla ověřena kinasová aktivita receptorů, největší míru aktivace po vazbě ligandu vykazovala *PcHK4a*. Kvantifikací cytokininů před a po inkubaci s bakteriální kulturou bylo potvrzeno, že isopentenyldenosin je skutečný ligand topolových receptorů.

## ABSTRACT

Cytokinins are phytohormones with a key role in the regulation of plant growth and development. They are divided into isoprenoid or aromatic group according to the nature of side chain bound to the exocyclic nitrogen atom of adenine. In this work, *Populus × canadensis* cv. *Robusta* was chosen as a model organism to study metabolism and perception of aromatic cytokinins as it contains *ortho*-topolin and its riboside, also bound in the poplar tRNA. All nine poplar isopentenyl transferase genes (*PcIPT*), coding enzymes fundamental for isoprenoid cytokinin biosynthesis, as well as all five cytokinin receptors histidine kinase genes (*PcHK*) were cloned. The levels of gene expression were analyzed using quantitative PCR across various poplar organs. The majority of *PcIPT*s was proved to be functional *in vivo* after their inducible expression in *Arabidopsis thaliana*. These transgenic lines produced substantial amounts of *trans*-zeatin and isopentenyl adenine metabolites. Surprisingly, levels of *cis*-zeatin type cytokinins were also elevated in some cases. *PcHK* were functionally expressed in *Escherichia coli* to perform live cell binding assay for determination of receptors ligand specificities and pH optima. The majority of cytokinins exhibited the strongest binding to *PcHK2*. Additionally, kinase activities of the receptors were verified, *PcHK4a* displayed the highest activation by ligand binding. The quantification of cytokinins before and after their incubation with bacterial cultures proved that isopentenyl adenosine is a true ligand of poplar receptors.



## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>2</b>
2.1	Struktura a výskyt cytokininů	2
2.2	Metabolismus cytokininů	3
2.3	Cytokininové receptory a signalizace	4
2.4	Fyziologické funkce cytokininů	6
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>9</b>
4.1	Výběr modelového organismu pro studium aromatických cytokininů	9
4.2	Charakterizace topolových isopentenyltransferas	11
4.3	Charakterizace cytokininových receptorů z topolu	16
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>26</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE</b>	<b>27</b>

## 1 CÍLE PRÁCE

- Shrnutí aktuálních poznatků o výskytu, metabolismu, percepci a fyziologických funkcích cytokininů v rostlinách.
- Pilotní experimenty – selekce vhodného modelového organismu, odvození a charakterizace *in vitro* kultury topolu *Populus × canadensis* cv. *Robusta*.
- Molekulární klonování genů kódujících isopentenyltransferasy z *P. × canadensis* (*PcIPT*) a analýza jejich genové exprese.
- Heterologní exprese *PcIPT* v *Escherichia coli* a *Arabidopsis thaliana*, charakterizace rekombinantních *PcIPT*.
- Molekulární klonování genů kódujících histidinkinasové cytokininové receptory z *P. × canadensis* (*PcHK*) a analýza jejich genové exprese.
- Heterologní exprese *PcHK* v *E. coli* a charakterizace rekombinantních *PcHK*.

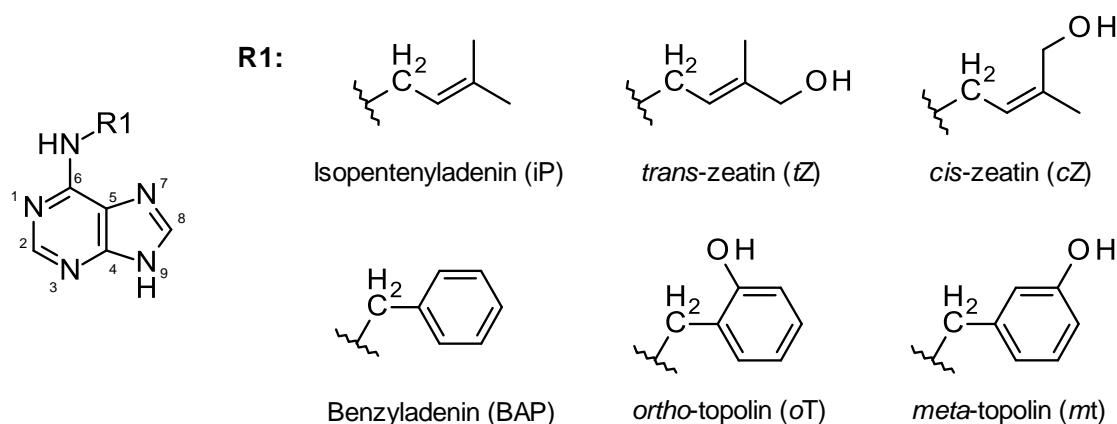
## 2 TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Struktura a výskyt cytokininů

Cytokiny jsou hormony významně se podílející na regulaci vývoje a růstu rostlin. Všechny přirozeně se vyskytující cytokiny jsou  $N^6$ - substituované deriváty adeninu. U vyšších rostlin se všudypřítomně vyskytují cytokiny s isoprenoidním postranním řetězcem, aromatické cytokiny jsou naopak poměrně vzácné. U bakterií a eukaryotních organismů jsou navíc isoprenylované adeninové báze součástí některých populací tRNA a podílí se na stabilizaci interakce kodon-antikodon (Persson et al. 1994).

Prvním (isoprenoidním) cytokininem izolovaným z rostlinného materiálu – z nezralých obilok kukuřice (*Zea mays*), podle které byl pojmenován – byl *trans*-zeatin (*tZ*; Letham, 1963). Brzy po té byl objeven byl  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)-adenin (*iP*; Obr. 1) produkovaný patogenní bakterií *Rhodococcus fascians* (Klämbt et al. 1966). Ze směsi malých RNA špenátu a hrachu se také podařilo izolovat *cis*-zeatin (*cZ*), respektive jeho ribosid (Hall et al. 1967). Z obou zeatinových isomerů je *tZ* biologicky podstatně aktivnější (Spíchal et al. 2004; Romanov et al. 2006) a společně s *iP* je dlouhodobě považován ze převládající typ cytokininů (Frébort et al. 2011). Nicméně *cZ*-typ je také vysoce abundantní, v některých rostlinách (řády liliotvaré, hvězdicotvaré nebo čeled' lipnicovité) a v určitých vývojových stádiích (například semena nebo senescentní listy) dokonce převažuje (Gajdošová et al. 2011).

Mezi cytokiny s aromatickým postranním řetězcem patří  $N^6$ -benzyladenin (*BA*) a jeho hydroxylované deriváty *ortho*- a *meta*-topolin (*oT* a *mT*; Obr. 1). Dlouhou dobu byly považovány za syntetické látky, ale mnoho derivátů aromatických cytokininů bylo později detekováno v listech topolu druhu *P. × canadensis*, což se odráží v triviálním názvu „topolin“ (Strnad et al. 1997). Jako první byl identifikován ribosid *oT* (*oTR*; Horgan et al., 1973). Skupina profesora Strnada z listů *P. × canadensis* dále izolovala *oT* (Strnad et al. 1992) a *oT*-9-glukosid (Strnad et al. 1994), *mT*, jeho ribosid a 9-glukosid (Strnad et al. 1997).



**Obrázek 1** Strukturální vzorce, názvy a zkratky vybraných cytokininových bází.

## 2.2 Metabolismus cytokininů

Stěžejním krokem biosyntézy isoprenoidních cytokininů je adice prenylové skupiny na exocyklický dusík adenosin-5'-fosfátu, případně adeninu vázaného v tRNA. Reakce je katalyzována isopentenyltransferasami (IPT), které kromě různých forem adeninu využívají jako substrát zejména dimethylallyldifosfát (DMAPP; Barry et al., 1984) a v některých případech také (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát (HMBPP; Krall et al., 2002). Isopentenyltransferasy se dělí do dvou skupin na vývojově starší tRNA IPT (EC 2.5.1.75), přítomné téměř ve všech živých organismech, a adenylátové IPT (EC 2.5.1.27) (Frébort et al. 2011).

Rostlinné IPT jako substrát silně preferují ATP a ADP, hodnota  $K_m$  pro AMP je řádově vyšší (Kakimoto 2001). Naopak jediným efektivním adeninovým substrátem IPT z *A. tumefaciens* je AMP (např. Krall et al. 2002). V případě tRNA IPT jsou substrátem tRNA, které rozpoznávají kodony začínající uracilem. Dochází k prenylaci adeninu na pozici 37, přičemž tato modifikace napomáhá stabilizovat interakci antikodon-kodon s mRNA (Persson et al. 1994). Bakteriální a rostlinné adenylátové IPT se liší také v preferenci donoru prenylové skupiny. Zatímco Tmr, IPT z *A. tumefaciens*, má přibližně stejné hodnoty  $K_m$  pro DMAPP i HMBPP, enzym z *Arabidopsis* HMBPP jako substrát nevyužívá (Sakakibara et al. 2005).

Primárním mechanismem tvorby *tZ*-typu cytokininů je u rostlin hydroxylace iP, zejména ve formě nukleotidů, katalyzovaná cytochromy P450. U *Arabidopsis* se konkrétně jedná o CYP735A1 a CYP735A2, které jsou oba stereospecifické a *cZ* produkují jen v zanedbatelném množství (Takei et al. 2004). Původ hydroxylové skupiny u *cis*- isomeru doposud nebyl spolehlivě vysvětlen. Původně předpokládaná možnost isomerace *tZ* hypotetickou *cis-trans*-isomerasou, částečně purifikovanou z nezralých semen fazolu (Bassil et al. 1993), nebyla prokázána. Domnělá *cis-trans*-isomerasa byla nedávno purifikována z kukuřice a identifikován jako nukleotidpyrofosfátasa/ fosfodiesterasa (EC 3.6.1.9). Ukázalo se však, že isomerace *in vitro* probíhá spontánně. Ani nadexprese enzymu nevedla ke změnám poměru koncentrace *tZ* a *cZ* *in vivo* (Hluska et al. 2017).

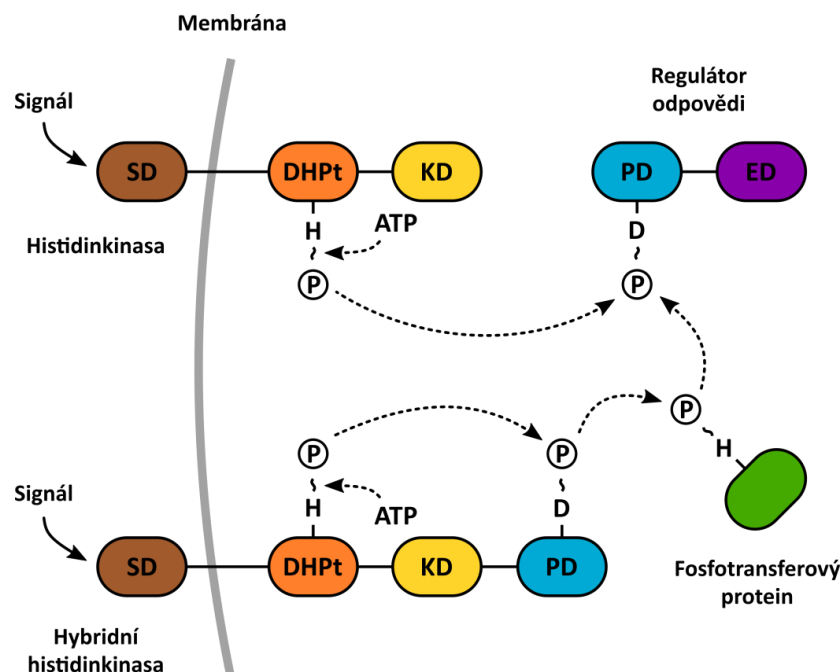
Aktivace primárních produktů biosyntézy, cytokininových nukleotidů, je spojena s odštěpením fosfátů a ribosy. Na interkonverzi jednotlivých forem cytokininů se mohou podílet enzymy obecného purinového metabolismu, jejich afinita k cytokininům je však nízká (Galuszka et al. 2008). Na odštěpení ribosy se podílí nukleosid-*N*-ribohydrolasy (NRH; EC 3.2.2.-; Kopečná et al. 2013). Enzym je běžně označován jako „LONELY GUY“ (LOG), jelikož květy rýže s mutací v příslušných genech často obsahovaly jedinou tyčinku a žádné pestíky (Kurakawa et al. 2007).

Pro regulaci hladin aktivních cytokininů v rostlinném pletivu je vedle biosyntézy neméně důležitá jejich degradace nebo inaktivace. Nevratná degradace cytokininů je založena na jejich oxidativním štěpení, které je katalyzováno enzymem původně pojmenován jako cytokininoxidasa. Produkty reakce jsou adenin, případně jeho  $N^0$ - substituovaný derivát (Whitty a Hall, 1974), a aldehyd postranního řetězce (Brownlee et al. 1975). Enzym je však schopen efektivněji využívat i jiné akceptory elektronů než molekulární kyslík (Galuszka et al. 2001; Frébortová et al. 2004) a byl proto překlasifikován na cytokinindehydrogenasu (CKX; EC 1.5.99.12).

Alternativním mechanismem pro snížení koncentrace aktivních cytokininů v rostlinném pletivu je jejich konjugace s glukosou, případně xylosou. Ke glykosylaci dochází typicky na hydroxylové skupině postranního řetězce cytokininů, je-li přítomna, a na purinovém skeletu v polohách  $N^7$  nebo  $N^9$ . Tvorbu *O*-glykosidů katalyzují *trans*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.203) využívající jako substrát UDP-glukosu (Dixon et al. 1989). Aktivní cytokininy mohou být z *O*-glykosidů opětovně uvolněny  $\beta$ -glukosidasou (EC 3.2.1.21; Brzobohatý et al., 1993). *O*-glykosidy jsou proto považovány za zásobní formu cytokininů. Nevratnou glykosylaci cytokininů v polohách  $N^7$  nebo  $N^9$  katalyzují *N*-glukosyltransferasy (EC 2.4.1.118), poprvé izolované z děložních lístků ředkve (Entsch a Letham, 1979).

### 2.3 Cytokininové receptory a signalizace

Percepci cytokininů zajišťují hybridní histidinkinasové receptory (HK), které jsou součástí tzv. systému dvou komponent (TCS; z anglického „two-component system“) široce rozšířeného u prokaryotních organismů. HK prototypické bakteriální TCS se skládá ze tří hlavních domén: extracelulární senzorké, dimerizační a histidin obsahující fosfotransferové domény (DHPT) a ATP vázající kinasové domény (West a Stock, 2001). Percepce signálu senzorkou doménou vede ke konformační změně, která se pohybem helikálních segmentů přenáší na cytosolární domény a dochází k aktivaci kinasy (Wang et al., 2013). Po autofosforylaci konzervovaných His reziduí na DHPT obou HK monomerů dochází k jejich interakci s přijímací doménou regulátoru odpovědi (RR; z anglického „response regulator“), která dále katalyzuje přenos fosfátu



**Obrázek 2** Schématické znázornění přenosu signálu prostřednictvím klasického prokaryotního TCS (nahore) a víceúrovňového TCS s hybridní HK (dole). SD = senzorká doména; DHPT = dimerizační a histidin obsahující fosfotransferová doména; KD = kinasová / katalytická doména; PD = přijímací doména; ED = efektorová doména. Obrázek byl vytvořen podle předlohy (Capra a Laub, 2012).

na vlastní konzervované Asp reziduum (Obr. 2, horní část). RR je tímto aktivován a jeho efektorová doména, která je typicky transkripčním faktorem, zprostředkovává reakci buňky na přijatý signál (Gao a Stock, 2009). Téměř 25 % všech známých HK je takzvaně hybridních, obsahují navíc přijímací doménu typickou pro RR. Tyto hybridní HK jsou součástí víceúrovňových TCS zahrnujících ještě histidin obsahující fosfotransferový protein (HPt), který je v signalizační kaskádě zařazen mezi HK a RR (Obr. 2, dolní část).

K identifikaci cytokininových receptorů vedlo několik nezávislých linií výzkumu. Mutace označovaná jako *wooden leg (wol)*, která působí narušení přirozené organizace cévních svazků v kořeni *Arabidopsis*, je důsledkem záměny v receptorové doméně tehdy blíže neurčené HK (Mähönen et al. 2000). Brzy po tomto zjištění byly v genomu *Arabidopsis* identifikovány tři receptorové HK označené jako AHK2, AHK3 a AHK4 (Ueguchi et al. 2001). Dvě skupiny nezávisle na sobě následně prokázaly, že AHK4 je cytokininový receptor identický s HK kódovanou genem *WOL* (Suzuki et al. 2001; Inoue et al. 2001). Funkce jednotlivých receptorů se překrývají, nicméně AHK2 a AHK3 mají dominantní úlohu v nadzemní části, zatímco AHK4 v kořenech (Higuchi et al. 2004; Stolz et al. 2011).

Pro vazbu cytokininů je stěžejní N-koncová doména HK, pojmenovaná jako CHASE (z anglického cyclase/histidine kinase-associated sensory extracellular). Její struktura pro AHK4 byla vyřešena (Hothorn et al. 2011), což umožňuje vysvětlit rozdílnou afinitu receptoru k jednotlivým ligandům. První systematická studie porovnávající aktivaci AHK3 a AHK4 různými cytokininy (Spíchal et al. 2004) využívala *E. coli* expresní systém produkující  $\beta$ -galaktosidasu v odezvě na cytokininový signál (Suzuki et al. 2001). Tento systém byl později upraven na kompetiční test, který umožňuje přesněji stanovit kinetické parametry vazby ligandu pomocí tritiem značeného *tZ* (Romanov et al. 2005, 2006).

Navazujícím článkem cytokininové signalizace je HPt. U *Arabidopsis* se jedná o skupinu celkem šesti malých proteinů, z nichž však jeden označovaný jako *pseudo-AHPt* (také AHPt6) postrádá His reziduum kritické pro přenos fosfátu (Suzuki et al. 2000). Pomocí fúze s GFP se také podařilo prokázat, že AHPt slouží jako člunek mezi cytosolem a buněčným jádrem (Hwang a Sheen, 2001). Ve většině případů mají HPt na přenos signálu pozitivní vliv a jejich funkce se částečně překrývají (Hutchison et al. 2006). AHPt6 je nejen neschopen přenášet fosfát, ale navíc inhibuje i ostatní AHPt a slouží tak jako negativní regulátor cytokininové signalizace (Mähönen et al. 2006).

Na konci transdukce cytokininového signálu figurují RR rozdělované zejména na typ A a B, které se liší přítomnými doménami a také funkcí. RR typu B obsahují přijímací doménu a DNA vázící doménu jsou aktivovány přenosem fosfátu z HPt na konzervované Asp reziduum a následně fungují jako transkripční faktory (např. Imamura et al. 1999; Sakai et al. 2001). Jednou ze skupin genů velmi rychle přepisovaných v důsledku aktivace RR typu B po percepci cytokininů jsou také RR typu A. *Arabidopsis* jich obsahuje celkem 10 a jejich sekvence je kratší než, je tomu u RR typu B, jelikož postrádají DNA vazebnou doménu (D'Agostino et al., 2000). Fungují jako negativní zpětnovazebné regulátory cytokininové signalizace s částečným překryvem jejich exprese napříč rostlinou (např. Hwang a Sheen, 2001).

## 2.4 Fyziologické funkce cytokininů

Cytokiny stimulují přechod buněk z  $G_1$  do S fáze (Riou-Khamlichi et al. 1999) a zejména z  $G_2$  do M fáze buněčného cyklu (Zhang et al. 1996), významně se proto podílejí na regulaci aktivity meristemických buněk. Jedním z genů indukovaných cytokiny je *WUSCHEL* (Zubo et al. 2017), kódující transkripční faktor klíčový pro udržení kmenových buněk apikálního meristému v nediferenciovaném stavu (Mayer et al. 1998). *WUSCHEL* zároveň funguje jako transkripční represor RR typu A, čímž brání zpětnovazební inhibici cytokininové signalizace (Leibfried et al. 2005). Cytokiny regulují také aktivitu kambia a radiální růst rostlin (Nieminen et al. 2008) a oddalují senescenci listů (Gan a Amasino, 1995).

Zatímco růst nadzemní části rostliny je cytokiny stimulován, jejich vliv na kořenový systém je opačný. Cytokiny ovlivňují distribuci auxinů v kořeni prostřednictvím regulace exprese jejich transportérů (Moubayidin et al. 2010). V důsledku tím podporují diferenciaci buněk a negativně ovlivňují velikost kořenového meristému (Dello Ioio et al. 2007), ale také zakládání postranních kořenů (Laplaze et al. 2007). V raných fázích embryogeneze pak souhra působení cytokininů a auxinů řídí specifikaci kmenových buněk, které později utvářejí kořenový meristéum (Müller a Sheen, 2008). Koordinace auxinové a cytokininové signalizace je nezbytná pro udržení apikální dominance, po odstranění apexu dochází k uvolnění inhibice a cytokiny následně stimulují růst postranních větví (Tanaka et al. 2006).

Cytokiny se dále podílejí na regulaci reakcí rostlin na vnější podmínky, zejména světlo a dostupnost minerálních živin. Při zastínění rostliny vzroste podíl vzdáleného červeného světla indikovaný fytochromy, což vede k auxiny indukované expresi *AtCKX6*. Důsledkem je zvýšená degradace cytokininů v listových primordiích a zastavení jejich vývoje ve prospěch dlouhivého růstu (Carabelli et al. 2007). Cytokiny aktivovaný *ARR4* prostřednictvím fytochromu B pak mimo jiné zpožďuje fázi rostlinného cirkadiálního rytmu (Hanano et al. 2006). Přídavek anorganického dusíku do pěstebního média vede k nárůstu koncentrace cytokininů v kořeni a xylémové šňávě (např. Takei et al., 2001b), což ovlivňuje růst rostlin a řadu vývojových procesů. Pod cytokininovou kontrolou je také exprese transportérů fosfátů, sulfátů nebo železa (Werner a Schmölling 2009).

Poměrně rozsáhlým tématem je úloha cytokininů při interakci rostlin s mikroorganismy. Nejlépe prostudovaným příkladem je infekce rostlin bakterií *A. tumefaciens*, která během tvorby hálek integruje do rostlinného genomu část svého Ti-plasmidu kódující mimo jiné IPT. Prostřednictvím produkce *tZ* v plastidech pak ovlivňuje dělení hostitelských buněk (Sakakibara et al. 2005). Podobnou strategii využívá bakterie *R. fascians*, která během infekce vylučuje směs několik cytokininů (Pertry et al. 2009). Cytokiny jsou stěžejní také pro tvorbu kořenových hlízek u luštěnin, bez kterých nejsou symbiotické bakterie druhu *Rhizobium* schopné fixovat dusík (Murray et al. 2007).

### 3 MATERIÁL A METODY

Detailní popis použitých metod je uveden v disertační práci, případně v publikacích (Jaworek et al. 2019a, b).

#### ***Populus × canadensis (cv. Robusta)***

Mladé stromky byly zakoupeny od Výzkumného ústavu lesního hospodářství a myslivosti (VÚLHM) - Výzkumná stanice Kunovice. Biologický materiál z dospělého topolu, který byl určen dendrologem VÚLHM, byl sbírán v Olomouci (GPS souřadnice: 49°35'44"N, 17°13'39"E). Kalusovou kulturu topolu odvodila a poskytla skupina RNDr. Jany Malé, CSc. z VÚLHM.

#### ***Arabidopsis thaliana***

Semena divokého typu (WT) *Arabidopsis* ekotypu *Columbia* poskytl kolega Mgr. David Zalabák, Ph.D., do WT rostlin byly transformovány adenylátové *PcIPT*. Semena dvojitého mutanta *atipt 2 9* poskytl prof. Tatsuo Kakimoto (Osaka University, Japonsko), do těchto rostlin byla transformována tRNA *PcIPT9*. Transgenní rostliny *Arabidopsis* exprimující topolové *PcIPT* fúznové s Myc tagem pod kontrolou estradiolem indukovatelného promoteru připravil Mgr. David Zalabák, Ph.D. (Jaworek et al. 2019a). Pro selekci homozygotních linií bylo použito MS10 médium pH 5,7 doplněné o 30 mg l<sup>-1</sup> hygromycinu B. Exprese *PcIPT* byla indukována postřikem 5 μM 17-β-estradiolu na tři týdny staré semenáčky.

#### ***Purifikace a analýza cytokininů***

Volné cytokininy byly izolovány a přečištěny podle Åstot et al. (2000) s drobnými úpravami (Novák et al. 2003) pomocí extrakce na pevné fázi. Izolace tRNA byla provedena metodou založenou na ošetření extraktu roztokem fenolu a *m*-kresolu s následným oddělením DNA a ostatních typů RNA postupnou precipitací (Maaß a Klämbt, 1981), která byla modifikována podle (Stirk et al. 2012). Vzorky byly analyzovány UHPLC-MS/MS (LCMS-8050, Shimadzu) podle Novák et al. (2008).

#### ***Molekulární klonování a analýza genové exprese PcIPT a PcHK***

Kódující sekvence většiny genů byly amplifikovány z cDNA, v případě *PcIPT7a* a *PcIPT7b* byla jako templát použita genomická DNA. Všechny sekvence byly následně klonovány do vektoru Zero Blunt, transformovány do kompetentních buněk *E. coli* NEB-5α (*PcIPT* a housekeeping geny) nebo NEB-10β (*PcHK*) pro produkci plasmidů a sekvenovány. Vybrané geny byly navíc syntetizovány s optimalizací kodonu pro expresi v *E. coli* (GenScript, Piscataway, NJ, US). *PcIPT* byly následně klonovány do expresních vektorů pCDFDuet-1, pETDuet-1 nebo pET-28a, pro produkci rekombinantních proteinů byly použity T7 expresní buňky *E. coli*. *PcHK* byly dále klonovány do vektoru pINIIIΔEH a exprimovány v *E. coli* kmene KMI001, které byly použity pro vazebné a kompetiční testy.

Pro analýzu genové exprese pomocí kvantitativní PCR byly použity dvojité značené (6FAM-TAMTA) TagMan próby. Plasmidy nesoucí sekvence jednotlivých *PcIPT* a *PcHK* posloužily jako templáty pro ověření PCR účinnosti a specificity příslušných primerů a prób. Hodnoty C<sub>T</sub> („cycle treshold“) byly normalizovány vzhledem k housekeeping genům.



### ***Expresa PcIPT v Escherichia coli a purifikace rekombinantních proteinů***

Ve snaze zvýšit podíl PcIPT v rozpustné fázi během exprese v *E. coli* byla testována různé koncentrace IPTG, kultivační časy a teploty a přídavky aditiva do média. Pro lýzy buněk a následnou purifikaci proteinů byly použity pufrů (Tris/HCl, HEPES nebo K-fosfátový) s pH upraveným podle isoelektrických bodů rekombinantních proteinů. Inkluzní tělíska byla solubilizována 6 M močovinou, 6 M guanidinem nebo 2,2% N-lauroylsarkosinem. Purifikace rekombinantních proteinů byla provedena na kobaltových kolonách HisPur (Thermo Fischer Scientific), případně vsádkou pomocí sepharosy s navázanými ionty  $\text{Co}^{2+}$ . Vzorky byly následně zakonzentrovány na kolonách Amicon 10 kDA (Merck). Pro opětovné skládání denaturovaných proteinů byla vyzkoušena dialýza nebo gelová filtrace, během které bylo ze vzorků postupně odstraněno chaotropní činidlo. Enzymatická aktivita PcIPT ve vzorcích byla ověřena metodou podle Béres et al. (2012).

### ***Vazebné, kompetiční aktivační testy PcHK***

Vazba cytokininů k PcHK byla studována pomocí vazebných a kompetičních testů s živými buňkami *E. coli* KMI001 exprimujícími jednotlivé receptory podle Romanov et al. (2005, 2006) s drobnými úpravami (Kuderová et al. 2015). Bakteriální kultury byly inkubovány s [ $^3\text{H}$ ]-*tZ* za přítomnosti: 1) 0,1% DMSO pro stanovení maximální vazby radioligandu, 2) nadbytku neznačeného *tZ* pro určení nescifické vazby, 3) různých kompetitorů – cytokininů v rozmezí koncentrací od 0,01 nM do 10  $\mu\text{M}$ . Analýza byla provedena pomocí scintilačního počítáče. Průměrné hodnoty  $K_D$  pro [ $^3\text{H}$ ]-*tZ* byly stanoveny pomocí Scatchardovy analýzy (Scatchard 1949). Hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých kompetitorů vypočtené ze získaných křivek byly převedeny na  $K_i$  podle (Cheng a Prusoff 1973).

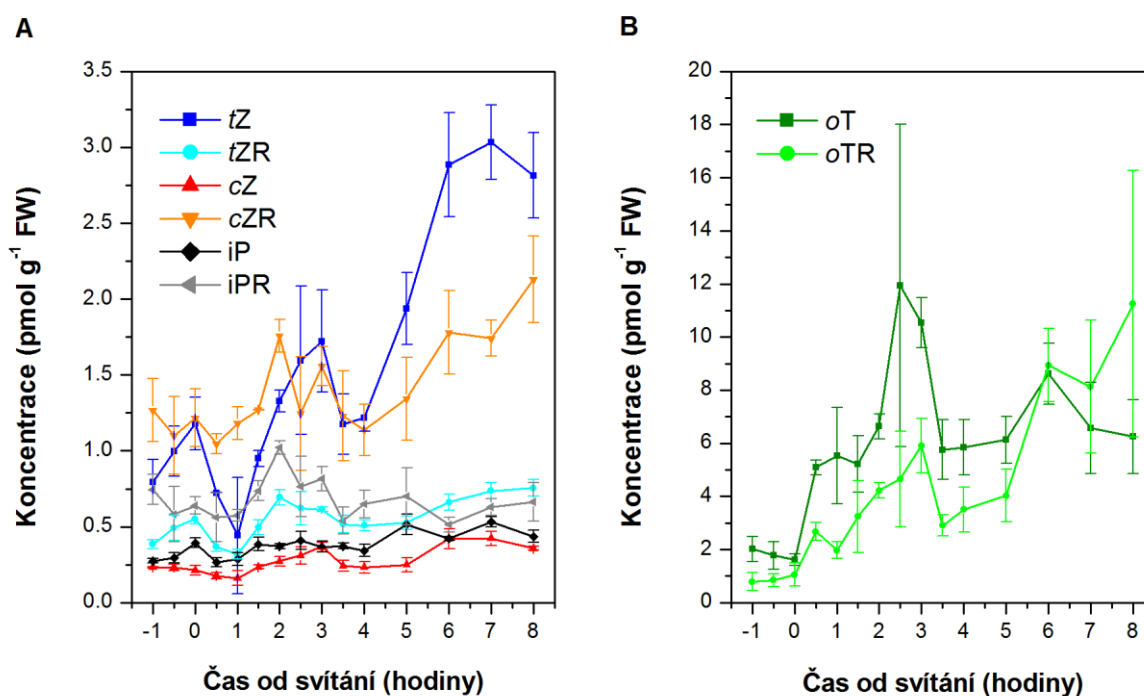
pH optimum PcHK bylo stanoveno v sadě MES a MOPS pufrů v rozmezí pH od 5,5 do 8,0. Stabilita ribosidů v průběhu inkubace byla testována s využitím iPR nebo iPR, jejich koncentrace před a po inkubaci byla stanovena pomocí UHPLC-MS/MS. Vzorky inkubované navíc s kukuřičnou nukleosidribohydrolasou (Kopečná et al. 2013) sloužily jako pozitivní kontrola hydrolýzy iPR. Schopnost PcHK fosforylovat navazující fosfotransferový protein bakteriálního TCS byla ověřena stanovením aktivity  $\beta$ -galaktosidasy podle (Spíchal 2011). Transkripce reportérového gen *lacZ* je v případě *E. coli* KMI001 aktivována v důsledku cytokininové signalizace. Jako fluorogenní substrát byl použit 4-methylumbeliferylgalaktosid, signál byl normalizován na optickou hustotu bakteriální kultury a délku inkubace.

## 4 VÝSLEDKY

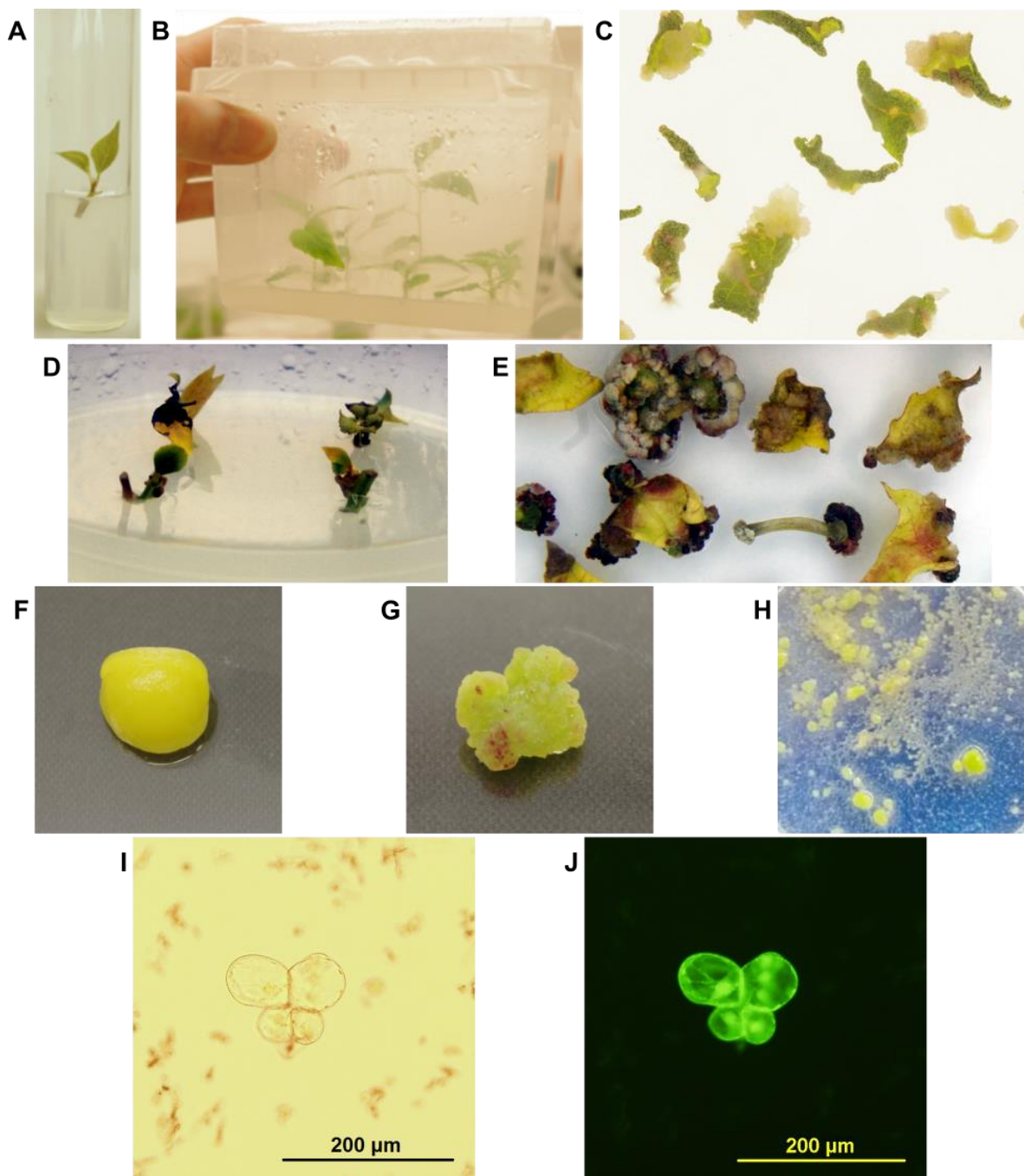
### 4.1 Výběr modelového organismu pro studium aromatických cytokininů

Aromatické cytokinininy byly poprvé identifikovány v listech *P. × canadensis* (např. Horgan et al., 1975; Strnad et al., 1992), který byl pro další práci zvolen jako nejvýhodnější model. Na rozdíl od řady dalších ověřovaných organismů se u něj podařilo opakovaně potvrdit přítomnost *oT* a *oTR* pomocí UHPLC-MS/MS. Jejich hladiny v listech mladých topolů navíc vykazovaly dynamiku v závislosti na délce osvětlení (Obr. 3). Ve vzorcích listů dospělého topolu byl nárůst hladin mnohem výraznější, koncentrace *oT* stoupla 4 hodiny po osvětlení až na úroveň 250 pmol g<sup>-1</sup> FW (Jaworek et al. 2019a). Podařilo se také potvrdit pilotní měření provedená Mgr. Kateřinou Podlešákovou ukazující, že *oTR* je vázán v tRNA izolované z *P. × canadensis*. Jeho množství odpovídalo přibližně 4,5 ± 0.5 pmol g<sup>-1</sup> FW.

Zatímco odvození kalusové *Populus tremula* × *Populus alba*, který byl použit pro osvojení metod práce s rostlinnými explantátovými kulturami, bylo poměrně snadné (Obr. 4A-C), analogický postup v případě *P. × canadensis* nefungoval. Explantáty ztrácely chlorofyl a brzy umíraly (Obr. 4D-E). Kalusovou kulturu pěstovanou v kapalném MS20 médiu obsahujícím *tZ* se nakonec podařilo získat ve spolupráci se skupinou RNDr. Jany Malé, CSc. (VÚLHM). Původní kalusy (Obr. 4F), označované v dalším textu jako „kalus A“, začaly produkovat po přenosu na tuhé médium chlorofyl a nediferenciované pletivo kalusů změklo (Obr. 4G). Tento typ kalusů je dále označován jako „kalus B“ a byla z něj odvozena kultura blízké buněčné suspenzi (Obr. 4H, I). Životaschopnost buněk byla ověřena pomocí fluorescein diacetátu (Obr. 4J).



**Obrázek 3** Časový profil změn koncentrací vybraných isoprenoidních (A) a aromatických (B) cytokininů v plně rozvinutých listech mladých stromů *P. × canadensis*. Sběr listů byl proveden 3. července 2014, poprvé hodinu před východem slunce.

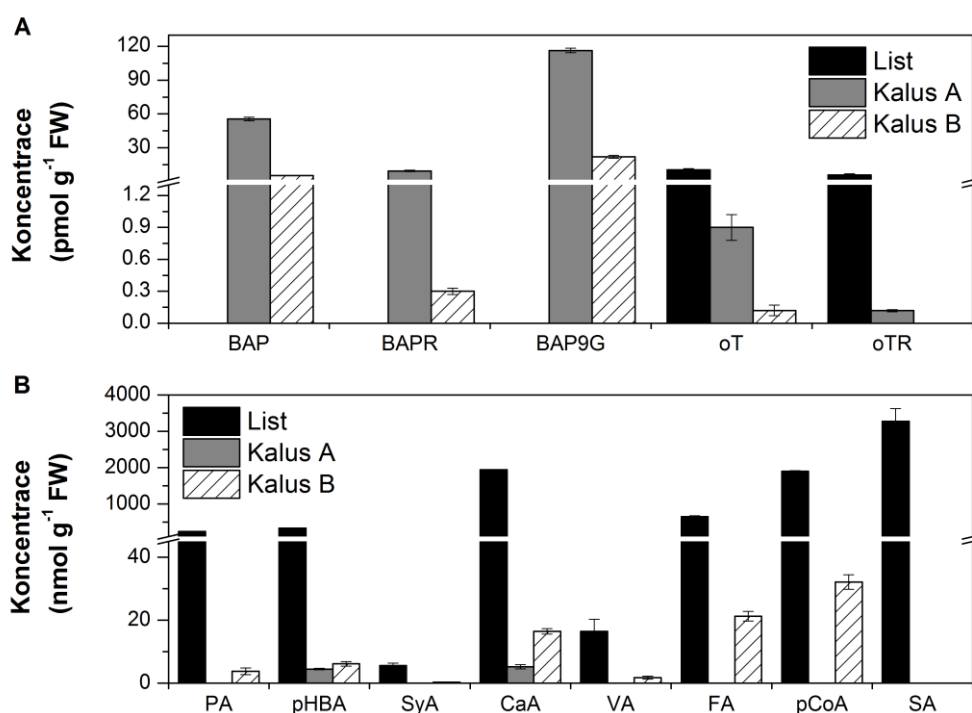


**Obrázek 4** Fotografie *in vitro* kultur hybridních topolů *P. tremula* × *P. alba* (A-C) a *P. × canadensis* (D-J). Explantát čerstvě přenesený do *in vitro* podmínek (A), rostliny se zregenerovaným kořenovým systémem (B) a tvorba kalusů na indukčním médiu (C). Snaha o přenos explantátů *P. × canadensis* do *in vitro* podmínek (D) a jejich regeneraci (E). Kalus odvozený RNDr. Janou Malou, CSc. udržovaný v kapalném MS20 médiu (F) a kalus po přenosu a několikerém pasážování na pevném MS20 médiu (G). Mikrokalusy vzniklé během snahy o odvození buněčné suspenzní kultury (H). Buňky v suspenzní kultuře pozorované pod mikroskopem ve viditelném spektru (I) a po obarvení fluorescein diacetátem (ověření životaschopnosti buněk) při excitační/emisní vlnové délce 490/530 nm (J).

V čerstvé kalusové kultuře *P. × canadensis* byly detekovány překvapivě vysoké koncentrace BAP a jeho cukerných konjugátů (Obr. 5A; v souhrnu přibližně 180 pmol g<sup>-1</sup> FW), které však po několikerém pasážování zcela vymizely. Kalusy také obsahovaly oT a oTR, nicméně jejich koncentrace byly řádově nižší (méně než 1 pmol g<sup>-1</sup> FW) než v listech mladých stromů. Toto množství bylo pro identifikaci prekursoru postranního řetězce aromatických cytokininů shledáno jako nedostatečné. Dále byly stanoveny koncentrace vybraných fenolických kyselin jakožto indikátorů, do jaké míry je u kalusů zachována šikimátová a fenylypropanoidová metabolická dráha. Oproti listům bylo množství fenolických kyselin v kalusech dramaticky sníženo (Obr. 5B), což mohlo vést k nízkému obsahu oT a oTR z důvodu nedostupnosti potenciálního prekursoru.

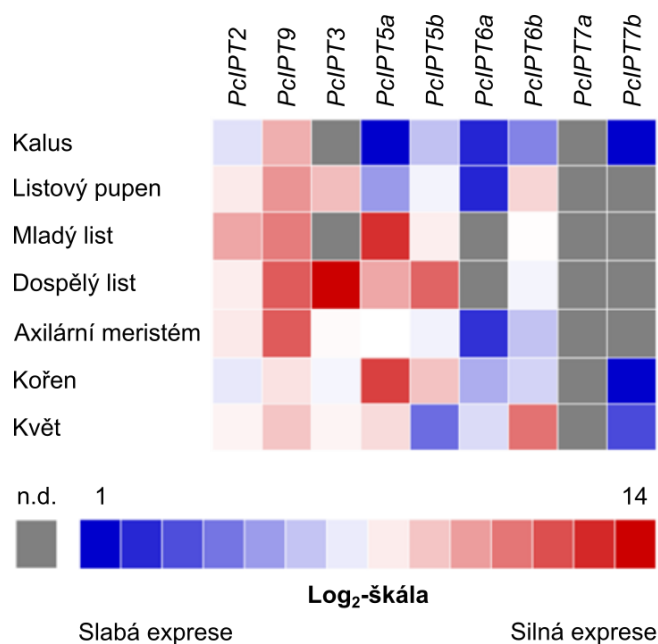
#### 4.2 Charakterizace topolových isopentenyltransferas

Všech devět *PcIPT* genů bylo klonováno a přesná znalost jejich sekvencí následně umožnila analýzu jejich exprese pomocí kvantitativní PCR (Obr. 6). Silná exprese *PcIPT3* v dospělých listech a naopak nepřítomnost jeho transkriptů v mladých listech je podobná jako v případě *SIPT3* z rajčete (Žižková et al. 2015). Gen kódující vysoce aktivní *PcIPT5a* (Jaworek et al. 2019a) byl nejsilněji exprimovaným v mladých listech a kořenech. Zatímco



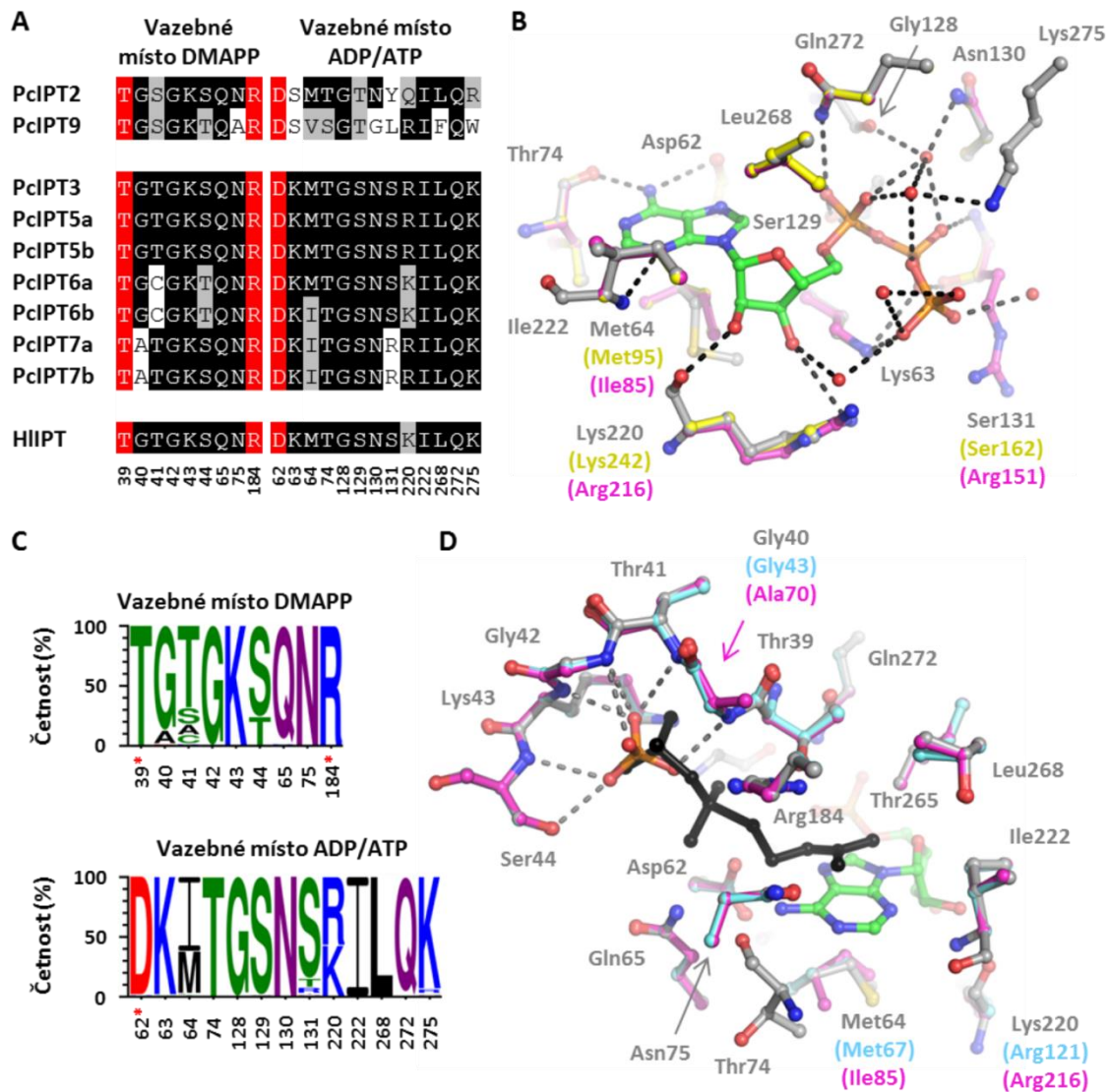
**Obrázek 5** Koncentrace aromatických cytokininů (**A**) a vybraných fenolických kyselin (**B**) stanovených ve vzorcích kalusů a v listech mladých stromů *P. × canadensis* sklizených 3 hodiny po východu slunce. Panel **B** zobrazuje součet koncentrací volných fenolických kyselin, jejich glykosidů a esterů. Kalusy A a B odpovídají těm prezentovaným na Obr. 9F respektive Obr. 9G. BAP(R) = benzyladenin(ribosid); BAP9G = benzyladenin-9-glukosid. PA = kyselina protokatechová; pHBA = kys. *para*-hydroxybenzoová; SyA = kys. syringová; CaA = kys. kávová; VA = kys. vanilová; FA = kys. ferulová; pCoA = kys. *para*-kumarová; SA = kys. salicylová.

*PcIPT6a* je exprimován jen velice slabě, značné množství transkriptů *PcIPT6b* bylo detekováno zejména ve květech *P. × canadensis*. Paralogní geny *PcIPT7* pak nebyly ve studovaných orgánech exprimovány vůbec nebo jen extrémně slabě. Tyto výsledky dobře korespondují s expresními profily příslušných *IPT* u *Populus tremula* a *P. trichocarpa* (<https://popgenie.org>). Naopak *PcIPT9* byl poměrně silně exprimován napříč všemi orgány včetně kalusů, u kterých je exprese všech ostatních *PcIPT* velmi nízká. Důvodem je nejspíš jejich kultivace na médiu obsahujícím *tZ*. Exogenní aplikace cytokininů vedla k negativní regulaci exprese adenylátových *IPT*, ale nikoliv *tRNA IPT*, také například u *Arabidopsis* (Miyawaki et al. 2004).



**Obrázek 6** Expresní profil *IPT* genů *P. × canadensis* ve vybraných orgánech znázorněný pomocí mapy intenzity. Absolutní počty transkriptů na 1 ng celkové RNA jsou vyjádřeny jako  $\log_2$  s přiřazenými barvami od nejnižších (modrá) po nejvyšší (červená) hodnoty. Šedá barva je použita v případech, kdy exprese příslušného genu nebyla detekována (n.d.).

Aminokyselinové složení aktivního místa topolových *IPT* bylo blíže prostudováno se záměrem posoudit možnost využití potenciálního aromatického analogu DMAPP nebo HMBPP jako substrátu. Rezidua v aktivním místě adenylátových *IPT* topolu jsou značně konzervovaná, největší rozdíly byly nalezeny u paralogů *PcIPT6* a *PcIPT7* (Obr. 7A). Žádná z přítomných záměn však není v rámci souboru 99 porovnávaných sekvencí unikátní (Obr. 7C). S využitím struktury chmelové HIIPT (Chu et al., 2010; PDB ID: 3A8T) jako templátu byly zkonstruovány modely několika vybraných *PcIPT*. Záměny Arg220 (číslování podle HIIPT) přítomného u paralogů *PcIPT6* za Lys u ostatních topolových *IPT* stejně jako Ile64 u *PcIPT6b* a obou paralogů *PcIPT7* za Met jsou pravděpodobně bez výraznějších důsledků pro vazbu substrátu. Arg přítomný u obou *PcIPT7* namísto Ser131 potom může vést ke zvýšení afinity k ADP/ATP díky intenzivnější polární interakci s fosfátovými skupinami (Obr. 7B). Variace reziduí na pozicích 40, 41 a 44 v rámci DMAPP vazebního místa (Obr. 7A, C) ovlivňují vazbu substrátu také jen minimálně. Tyto aminokyseliny totiž s fosfátovými skupinami DMAPP interagují zejména prostřednictvím vodíkových vazeb vycházejících z dusíkových atomů hlavního polypeptidového řetězce (Obr. 7D).



**Obrázek 7** Porovnání aktivních míst IPT z *P. × canadensis*. Zarovnání aminokyselinových reziduí všech PcIPT a chmelové HIIPT (A); katalytická rezidua jsou vyznačena červeným podbarvením. Porovnání struktury ADP/ATP vazebného místa HIIPT (šedá) s modely PcIPT6a (žlutá) a PcIPT7b (magenta; B). Četnost výskytu aminokyselinových reziduí v aktivních místech 99 adenylátových IPT (C; stejný soubor jako pro fylogenetickou analýzu); obrázek byl vytvořen ve webové aplikaci WebLogo; katalytická rezidua jsou označena červenou hvězdičkou. Porovnání struktury DMAPP vazebného místa HIIPT (šedá) s modely PcIPT5a (azurová) a PcIPT7b (magenta; D). Všechny modely byly vytvořeny pomocí serveru Swiss-model podle struktury HIIPT (PDB ID: 3A8T) jako templátu. DMAPP (černá) v panelu D pochází ze superpozice (program WinCoot) struktury tRNA IPT *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 3EPL). Obrázky struktur byly vygenerovány a editovány v programech PyMol a Inkscape. Číslování reziduí se ve všech panelech řídí sekvencí HIIPT.

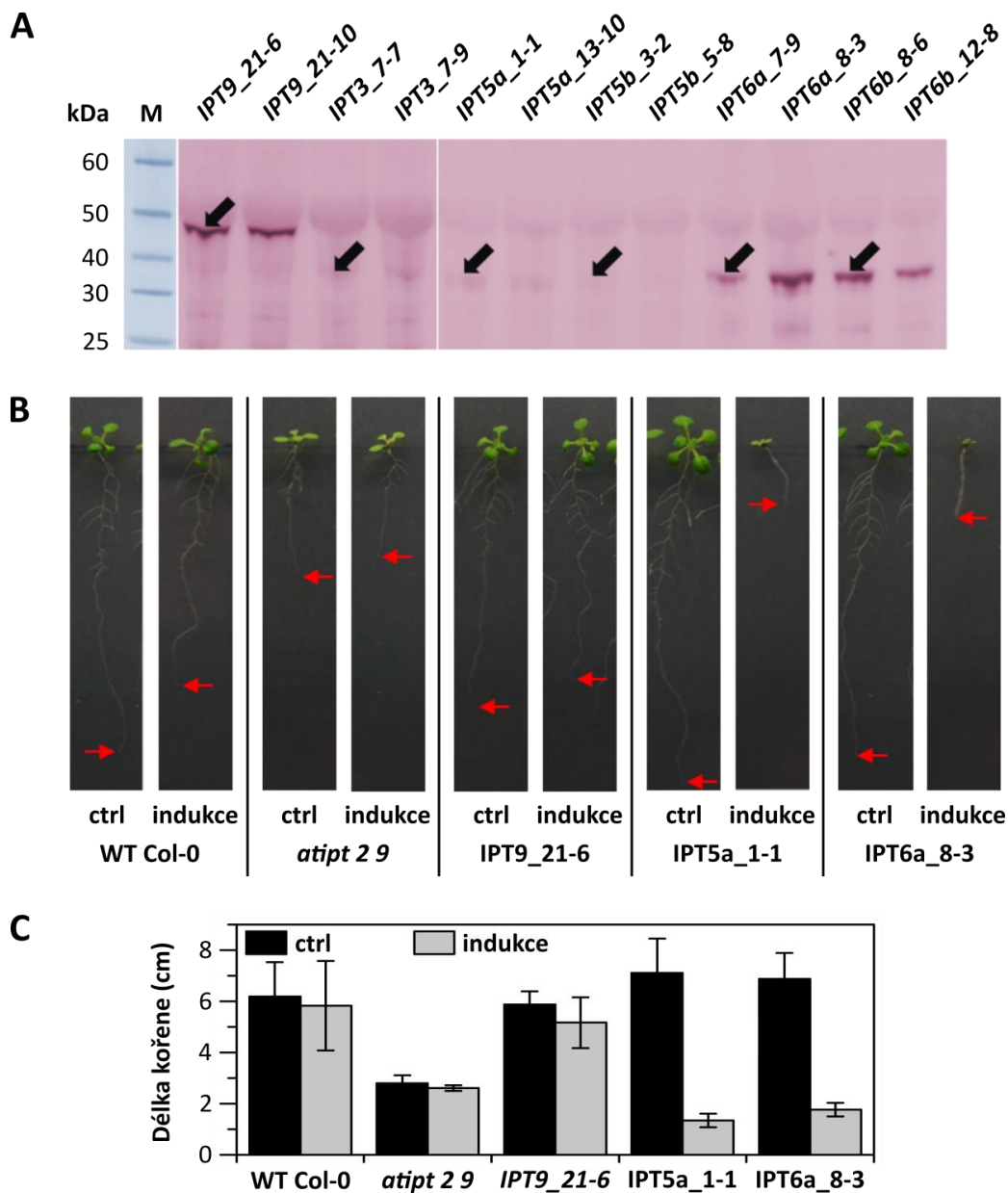
Pro produkci rekombinantních proteinů v *E. coli* bylo všech devět *PcIPT* genů překlonovalo do expresních vektorů pCDFDuet-1, pETDuet-1 nebo pET-28a(+). Přestože většina *PcIPT* byla v *E. coli* exprimována a identita příslušných proteinů byla ověřena, *PcIPT* agregovaly do inkluzních tělísek. Podobný problém se v minulosti podařilo vyřešit kultivací *E. coli* za podmínek osmotického stresu (Blackwell a Horgan, 1991), v případě *PcIPT* však tento přístup nepomohl. Nízká rozpustnost rekombinantních IPT produkovaných v *E. coli* byla zaznamenána také například u některých enzymů z rajčete (Žižková et al. 2015). Kromě snahy o optimalizaci podmínek kultivace a lýze bakteriálních buněk bylo bez žádoucího výsledku vyzkoušeno i několik postupů solubilizace a opětovného skládání rekombinantních *PcIPT*. V budoucnu je možné vyzkoušet použití expresních vektorů, které umožňují koexpresi cílového genu s eukaryotními chaperony, nebo *PcIPT* produkovat ve kvasinkách. Alternativně mohou být vyzkoušeny jiné podmínky purifikace či solubilizace, například IPT z chmele pomohla stabilizovat přítomnost ATP v dialyzačním pufru (Chu et al. 2010).

Funkčnost části *PcIPT* byla ověřena *in vivo* po jejich estradiolem indukované expresi v transgenních liniích *Arabidopsis*. Můj příspěvkem k této části práce byla kromě selekce homozygotních linií také ověření přítomnosti rekombinantních *PcIPT* v indukovaných rostlinách a sledování jejich fenotypu. Největší množství rekombinantních proteinů bylo po indukci detekováno u linií nesoucích *PcIPT9* a oba paralogy *PcIPT6*. Bylo detekováno relativně malé množství *PcIPT5a* (Obr. 8A), což ve spojitosti s množstvím cytokininů kvantifikovaných v příslušných rostlinách ukazuje na jeho vysokou aktivitu. Největší nárůst koncentrací isoprenoidních cytokininů včetně *cZR* monofosfátu byl pozorován u linií exprimujících *PcIPT5a* a oba paralogy *PcIPT6* (Jaworek et al. 2019a). Kontinuálně indukované rostliny nesoucí geny *PcIPT5a* a *PcIPT6a* měly také nejvýraznější fenotyp, který odpovídal mutantům *Arabidopsis* nadexprimujícím *AtIPT8* (Sun et al. 2003). Rostliny měly velmi krátký primární kořen bez větvení, zpomalený vývoj nadzemní části a malé listy (Obr. 8B, C).

Zvýšená hladina cytokininů *cZ*-typu byla překvapivá, neboť jejich výhradním zdrojem je u *Arabidopsis* degradace tRNA (Miyawaki et al. 2006). Při 1000x vyšších koncentracích iPR monofosfátu oproti WT mohlo docházet k jeho *cis*-hydroxylaci doposud neidentifikovaným cytochromem P450. Popsané CYP735A1 a CYP735A2 jsou totiž stereospecifické a podílí se výhradně na produkci cytokininů *tZ*-typu (Takei et al. 2004). Alternativní vysvětlení je isomerace *tZR* monofosfátu, která mohla při jeho koncentraci  $1015 \pm 61$  pmol g<sup>-1</sup> FW (linie *PcIPT6a\_8-3*) probíhat v opačném než preferovaném směru (Bassil et al. 1993; Hluska et al. 2017).

*PcIPT9* byla schopná komplementovat fenotyp mutantu *atipt2 9* (Obr. 8B, C), gen byl exprimován i bez předchozí indukce estradiolem. Bazální exprese *PcIPT9* byla dostatečná pro navrácení koncentrace v tRNA vázaného iPR na úroveň WT, koncentrace vázaného *cZR* však zůstala snižena. Za tuto modifikaci nejspíš odpovídá hlavně *PcIPT2*, podobně jako je tomu jejího orthologu z *Arabidopsis* (Miyawaki et al. 2006).

V žádné z transgenních linií nebyl detekován *oT* a *oTR*, ať už volný nebo vázaný v tRNA. Účast *PcIPT* na biosyntéze aromatických cytokininů se nezdá pravděpodobná. Modely *PcIPT* zkonstruované na základě struktury chmelové IPT jako templátu ukazují, že vazbě potenciálního aromatického substrátu by stericly bránilo reziduum Ile220 (Obr. 7D).



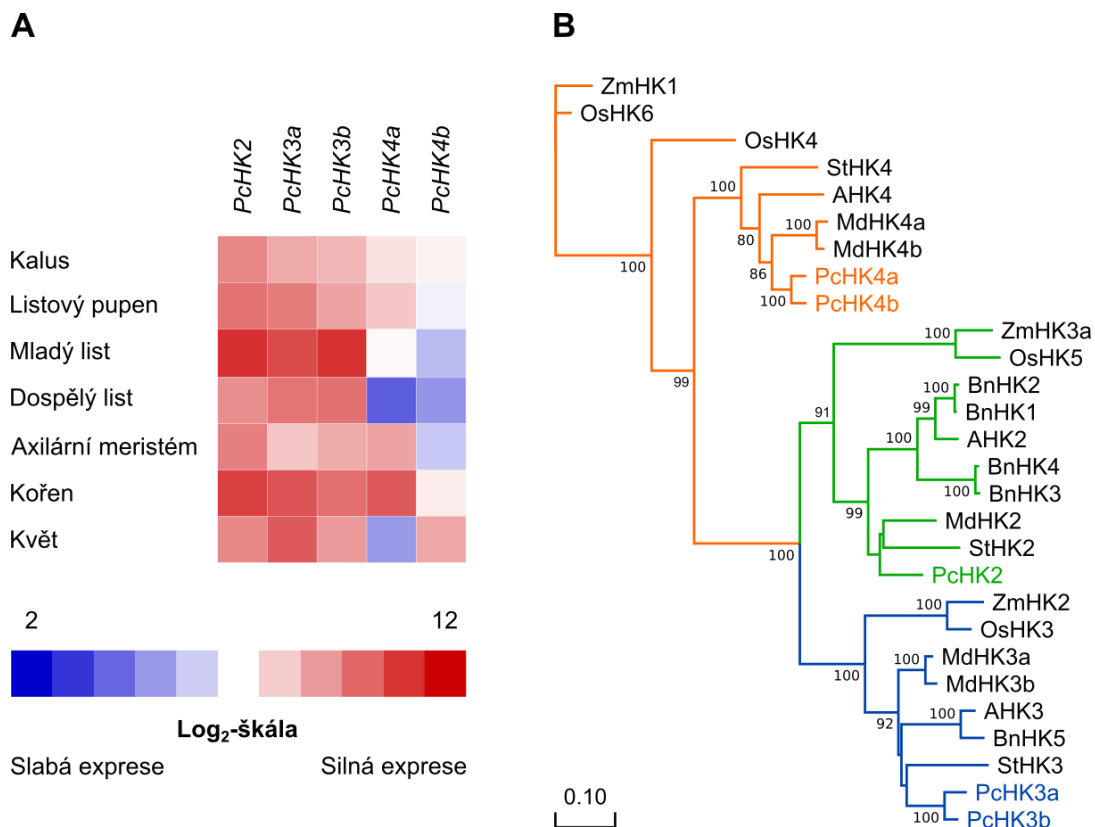
**Obrázek 8** Detekce PcIPT ve směsi proteinů izolovaných z transgenních rostlin *Arabidopsis* a jejich fenotyp. Fotografie polyvinilidenfluoridové membrány po western blottingu (**A**); PcIPT byly detekovány pomocí protilátky proti Myc tagu a sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatasou. Barvení membrány bylo provedeno roztokem NBT/BCIP. Sloupec s proteinovým markerem (Protein ladder 10-200 kDa; NEB) pochází z předcházejícího gelu po SDS-PAGE barveného Coomassie Brilliant Blue. Šipky označují očekávanou pozici jednotlivých PcIPT. Fotografie reprezentativních kontrolních (WT Col-0 a *atipt 2 9*) a transgenních rostlin *Arabidopsis* pěstovaných bez (ctrl) nebo s (indukce) estradiolem přidaným do média (**B**); červené šipky označují pozici kořenové špičky. Graf znázorňující průměrnou délku kořene kontrolních a transgenních rostlin (n = 6) - bez estradiolu v médiu (ctrl), nebo indukovaných (**C**).



### 4.3 Charakterizace cytokininových receptorů z topolu

Topol obsahuje celkem pět cytokininových receptorů. Přítomnost dvojic paralogů *PcHK3* a *PcHK4* je důsledkem duplikace genomu u čeledi vrbovitých (Tuskan et al. 2006). Funkční diverzifikaci paralogů *PcHK4* naznačují jejich rozdílné expresní profily (Obr. 9A). Zatímco *PcHK4a* byl podobně jako AHK4 (Higuchi et al. 2004) silně exprimován v kořenech, exprese *PcHK4b* byla celkově slabá s výjimkou květů. *PcHK2* a paralogy *PcHK3* pak jsou relativně silně exprimovány napříč všemi studovanými orgány. Fylogenetická analýza dále ukazuje, že k sobě mají evolučně blíže než k *PcHK4* (Obr. 9B). Expresní profil *PcHK* velmi dobře koreluje s expresí receptorů jabloně (Daudu et al. 2017).

Všech pět *PcHK* genů se podařilo klonovat a exprimovat v *E. coli* v aktivním stavu, což je poměrně vzácné. Například AHK2 v tomto heterologním expresním systému běžně nefunguje (Spíchal et al. 2004). Hodnoty  $K_D$  pro *tZ* se u všech topolových receptorů pohybují v rozmezí



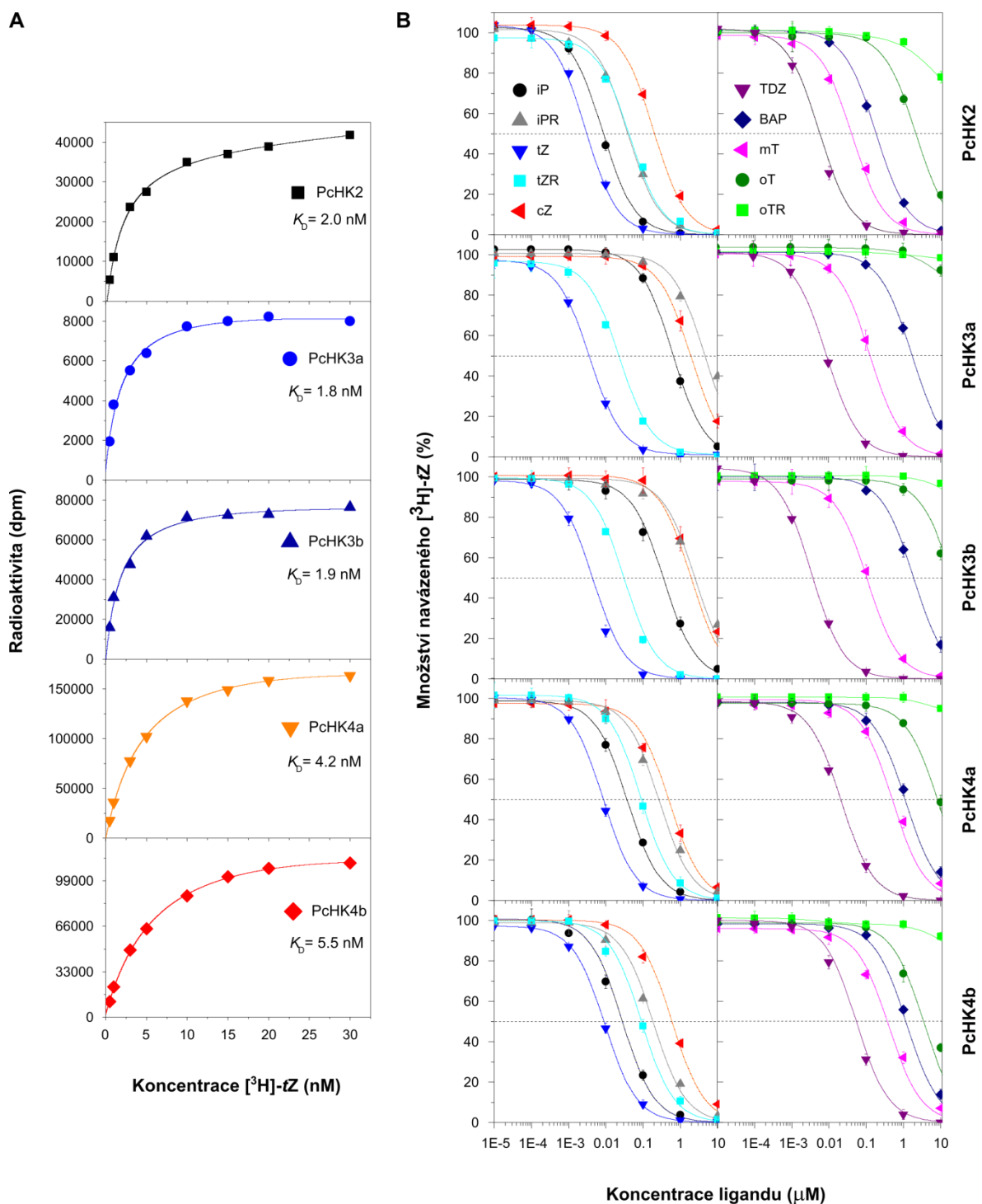
**Obrázek 9** Expresní profil *HK* genů z *P. × canadensis* ve vybraných orgánech znázorněný pomocí mapy intenzity (**A**). Absolutní počty transkriptů na 1 ng celkové RNA jsou vyjádřeny jako  $\log_2$  s přiřazenými barvami od nejnižších (modrá) po nejvyšší (červená) hodnoty. Fylogenetický strom vypočítaný metodou maximální věrohodnosti („maximum likelihood“) zahrnující celkem 28 aminokyselinových sekvencí HK ze šesti rostlinných druhů (**B**). Hodnoty uvedené v blízkosti jednotlivých uzlů reprezentují statistickou pravděpodobnost konkrétního větvení v procentech (metoda „bootstrapping“ s parametrem 1000 opakování). Měřítko udává průměrný počet záměn aminokyselin. Zkratky zobrazených rostlinných druhů: A = *Arabidopsis thaliana*, Bn = *Brassica napus*, Md = *Malus domestica*, Os = *Oryza sativa*, St = *Solanum tuberosum*, Zm = *Zea mays*.

1,5 – 5,0 nM (Tab. 1, Obr. 10A) podobně jako v případě *Arabidopsis* (Romanov et al. 2006; Lomin et al. 2015), nebo řepky (Kuderová et al. 2015). Jen s malým odstupem za *tZ* se na topolové receptory silně váže syntetický thidiazuron a kromě na PcHK3 také iP (Tab. 1, Obr. 10B). Nízkou afinitu PcHK3 k cytokininům iP-typu je možné vysvětlit kompozicí aktivního místa. Přítomnost dvou reziduí Ile (záměny oproti AHK4) pod rovinou tvořenou purinem vede k posunu ligandu blíže k postrannímu řetězci protilehlého Val a destabilizaci vaby. Hydroxylové skupiny na postranním řetězci *tZ* a *tZR* pak tvoří vodíkovou vazbu s reziduem Thr a kompenzují tím stérický efekt obou Ile (Jaworek et al. 2019b). Paralogy PcHK3 mají vysokou afinitu také k *tZR* a PcHK2 potom k iPR, cytokininové ribosidy jsou však obecně řádově horšími ligandy než příslušné volné báze.

Z aromatických cytokininů je nejlepším ligandem topolových receptorů *mT* se značným odstupem následovaný BAP (Tab. 1, Obr. 10B), jejichž přítomnost v topolu je však neprůkazná. PcHK2 váže aromatické cytokinininy nejlépe, což platí i pro její orthology z *Arabidopsis* (Romanov et al. 2006), řepky (Kuderová et al. 2015) nebo jabloně (Daudu et al. 2017). Většina studií rostlinných cytokininových receptorů nezahrnuje *oT* ani *oTR*, jelikož jejich schopnost aktivovat HK je obecně velice nízká (Spíchal et al. 2004). Za fyziologických podmínek může být potenciálně schopná vázat *oT* jen PcHK2 a případně podstatně slaběji ještě PcHK4b. Koncentrace *oT* v dospělých listech *P. × canadensis* může dosáhnout koncentrace až 250 nM (Jaworek et al. 2019a), což v případě PcHK2 odpovídá přibližně 20% saturaci receptoru. Schopnost *oT* aktivovat cytokininovou signalizaci *in vivo* se však nepodařilo prokázat (Jaworek et al. 2019b). Tyto výsledky společně s výraznými fluktuacemi hladin *oT* a *oTR* a pravděpodobně oddělenou biosyntetickou drahou podporují předpoklad, že aromatické cytokinininy mají v topolu jinou funkci než ty isoprenoidní (Strnad 1997).

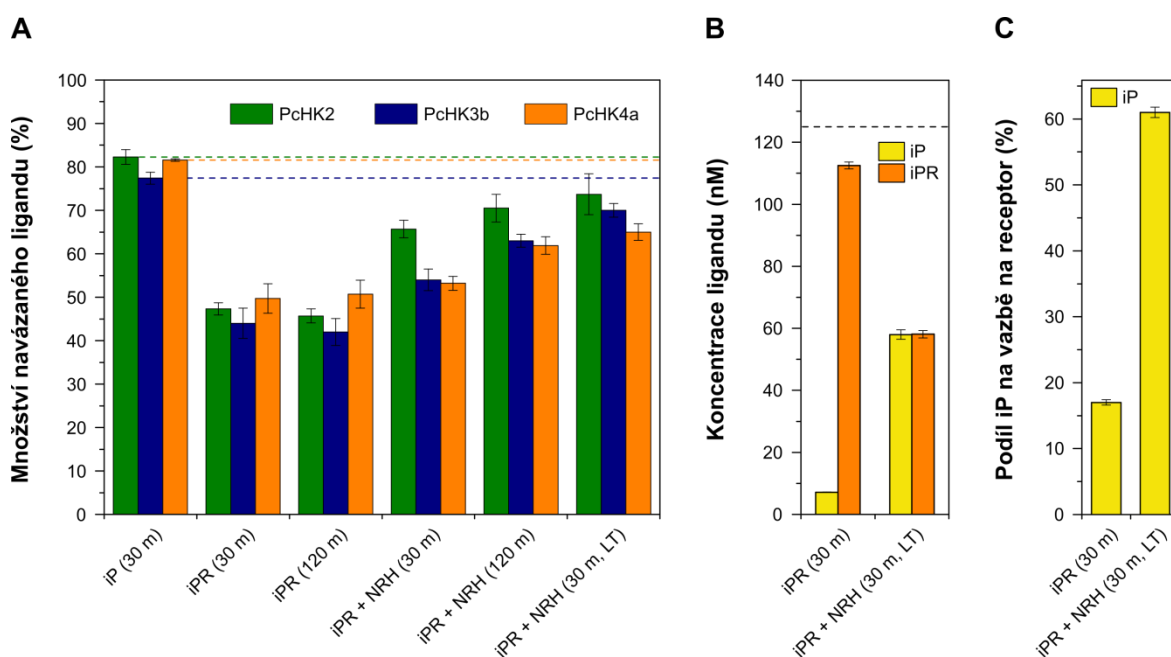
**Tabulka 1** Vypočtené hodnoty  $K_i$  pro jednotlivé kombinace cytokininů a PcHK, průměry a směrodatné odchylky zahrnují soubor nejméně tří replikátů.

Cytokinin	$K_i$ (nM)				
	PcHK2	PcHK3a	PcHK3b	PcHK4a	PcHK4b
iP	3.9 ± 0.2	236 ± 13	147 ± 13	17 ± 0.9	14 ± 1
<i>tZ</i>	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1	4.8 ± 0.2
<i>cZ</i>	106 ± 7	858 ± 113	1070 ± 194	205 ± 24	331 ± 22
iPR	22 ± 1	2270 ± 117	890 ± 81	125 ± 6	96 ± 11
<i>tZR</i>	24 ± 2	8.9 ± 0.8	11 ± 0.4	38 ± 3	53 ± 2.1
TDZ	2.2 ± 0.1	3.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	9.6 ± 0.5	23 ± 1
BAP	87 ± 5	704 ± 33	850 ± 82	601 ± 27	739 ± 39
<i>mT</i>	23 ± 2	55 ± 6	52 ± 5	302 ± 22	223 ± 16
<i>oT</i>	1100 ± 118	>5000	>5000	4500 ± 296	2820 ± 346



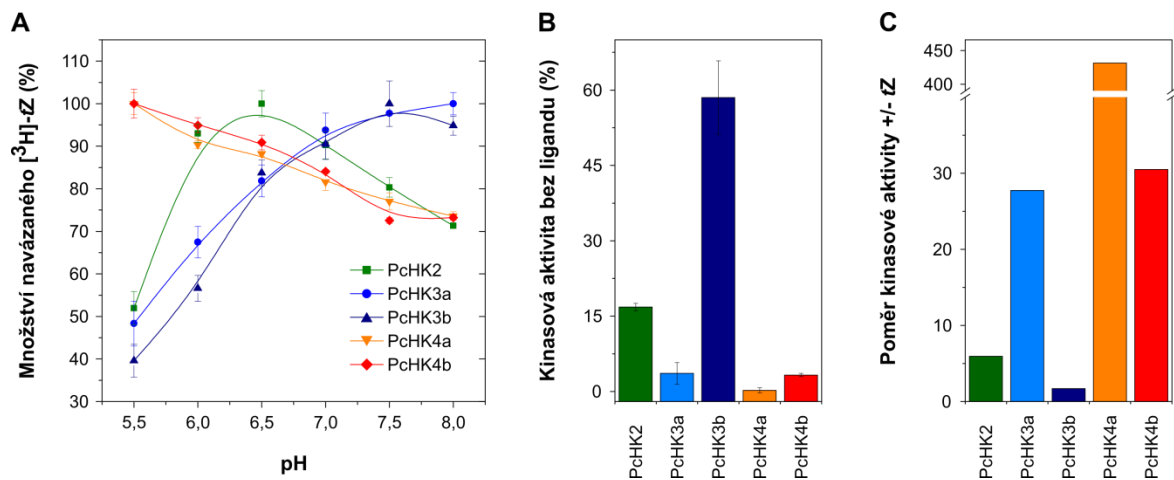
**Obrázek 10** Saturační křivky jednotlivých PcHK pro [<sup>3</sup>H]-tZ (**A**) a křivky znázorňující množství [<sup>3</sup>H]-tZ (koncentrace odpovídající  $K_D$ ) vázaného na PcHK během kompetice s různými cytokininy v koncentrační škále od 0,01 nM do 10  $\mu$ M (**B**). Všechna měření byla provedena s využitím živých buněk *E. coli* exprimujících jednotlivé PcHK. Radioaktivita [<sup>3</sup>H]-tZ vázaného na receptory byla měřena pomocí scintilačního počítače v jednotkách dpm (počet rozpadů za minute; z anglického “decays per minute”). Všechny inkubace byly provedeny při pH 7,0.

Schopnost HK vázat cytokininové ribosidy byla zpochybněna na základě stanovení kinetických parametrů receptorů v mikrosomální frakci rostlinných buněk (Lomin et al. 2015). Kontaminace mikrosomů cytosolárními enzymy však nebyla ověřena. Podle struktury CHASE domény AHK4 ve vazebném místě není pro ribosidy dostatek místa (Hothorn et al. 2011), nelze ale vyloučit možnost indukovaného přizpůsobení nebo rotaci adeninové báze okolo osy tvořené postranním řetězcem, ke které dochází u CKX (např. Kopečný et al. 2016). Bylo tedy ověřeno, zda jsou cytokininové ribosidy skutečnými ligandy PcHK, nebo zda jsou v průběhu experimentu štěpeny působením NRH. Množství ligandu navázaného na PcHK se během dvouhodinové inkubace s iPR neměnilo. Pokud by docházelo k hydrolyze iPR na iP, který má k receptorům vyšší afinitu, množství navázaného ligandu by s časem rostlo (Obr. 11A). Pomocí UHPLC-MS/MS byla dále stanovena koncentrace iP a iPR v reakční směsi. Množství detekovaného iP nebylo samo o sobě schopné vytěsnit 50 % [<sup>3</sup>H]-tZ (pozorovaná odezva), zbývajícím ligandem tedy musel být iPR (Obr. 11B,C). Receptory z *Arabidopsis* a kukuřice jsou navíc schopné vázat iP značený 7-nitrobenzofurazanem v poloze N<sup>9</sup> (Kubiasová et al. 2018).



**Obrázek 11** Stabilita iPR v průběhu kompetičního vazebného testu s PcHK2, PcHK3b a PcHK4a. Relativní vazbu iP a iPR v průběhu inkubace s *E. coli* exprimujícími příslušné receptory (A). Přerušované čáry naznačují výsledek očekávaný v případě, kdy by byl hydrolyzován veškerý přítomný iPR na iP. Koncentrace iP a iPR, stanovená pomocí UHPLC-MS/MS, přítomná v reakční směsi během inkubace iPR s *E. coli* exprimující PcHK4a (B). Přerušovaná čára indikuje původní koncentraci iPR (125 nM) přidanou do reakce. Relativní podíl iP na množství ligandu vázaného na PcHK4 (C) vypočítaný na základě jeho koncentrace v reakční směsi dosazené do rovnice křivky stanovené kompeticí s [<sup>3</sup>H]-tZ (Obr. 10B). Vzorky s přídatkem NRH sloužily jako pozitivní kontroly hydrolyzy iPR. LT = inkubace při laboratorní teplotě; ostatní vzorky byly inkubovány při 4 °C. Koncentrace ligandů odpovídaly hodnotám  $K_i$  pro iPR.

Jednotlivé PcHK se vzájemně liší pH optimumem a mírou kinasové aktivity v závislosti na navázaném ligandu. Zatímco oba paralogy PcHK4 váží cytokininy nejlépe ve slabě kyselém pH, zbývající tři receptory mají pH optima posunutá do neutrálních až slabě bazických hodnot (Obr. 12A). Z toho je možné usuzovat na jejich subcelulární lokalizaci v cytoplasmatické membráně (pH v apoplastu je ~5,5), respektive v endoplasmatickém retikulu (Romanov et al. 2018). PcHK3b se pak vyznačuje vysokou kinasovou aktivitou i bez přítomnosti ligandu (Obr. 12B) podobně jako jeho orthology z jabloně (Daudu et al. 2017). Ty byly schopné komplementovat kvasinkového mutanta *sln1*, který postrádá příslušný HK osmosenzor a za podmínek osmotického stresu hyne (Inoue et al. 2001), i bez přidání cytokininu do média. Mutantní varianty receptoru AHK4 označované jako *rock2* a *rock3* jsou také aktivní konstitutivně (Bartrina et al., 2017). Nárůst kinasové aktivity po vazbě *tZ* je nejvyšší u PcHK4a, oproti stavu bez navázaného ligandu se aktivita kinasové domény zvýší více než 400x (Obr. 12C).



**Obrázek 12** Vliv pH na vazbu [ $^3\text{H}$ ]-*tZ* na jednotlivé receptory (A) stanovený s využitím sady 100 mM MES a MOPS pufrů. Kinasová aktivita receptorů bez navázaného ligandu (B) relativně vztahovaná k maximální aktivitě v přítomnosti 1  $\mu\text{M}$  *tZ*. Poměr maximální kinasové aktivity receptorů a aktivity v nepřítomnosti ligandu (C). Absolutní hodnoty detekované fluorescence byly normalizovány na optickou hustotu bakteriální kultury a čas inkubace s ligandem (fluorescence  $\times$  OD<sub>600</sub><sup>-1</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>).

## 5 ZÁVĚR

- Jako modelový organismus pro studium aromatických cytokininů byl vybrán *Populus × canadensis* (cv. *Robusta*). Komplikace spojené s jeho kultivací *in vitro* však znemožnily identifikaci prekurzoru postranního řetězce *o*T-typu cytokininů, které topol produkuje a které jsou také součástí jeho tRNA.
- Bylo klonováno všech devět topolových *IPT* genů. Produkce příslušných rekombinantních proteinů do rozpustné fáze se v *E. coli* nezdařila z důvodu jejich agregace do inkluzních tělísek.
- Funkčnost části PcIPT byla prokázána po jejich indukovatelné expresi v *A. thaliana*. Transgenní linie nesoucí geny pro *PcIPT5a*, *PcIPT6a* a *PcIPT6b* produkují značná množství metabolitů iP a tZ. U těchto linií bylo překvapivě detekováno také zvýšené množství cZ-typu cytokininů.
- Podařilo se klonovat všech pět *PcHK* genů kódujících cytokininové receptory, které byly dále charakterizovány. Většina cytokininů včetně aromatických se nejsilněji váže na receptor PcHK2.
- Byla ověřena schopnost topolových receptorů vázat cytokininové ribosidy. Jednotlivé receptory se liší ve svých pH optimech a míře kinasové aktivity bez přítomnosti ligandu, která je nejvýraznější u PcHK3b. Nejsilněji je cytokinininy naopak aktivována PcHK4a.

## 6 LITERATURA

- Ástot C, Dolezal K, Moritz T, Sandberg G (2000) Deuterium in vivo labelling of cytokinins in *Arabidopsis thaliana* analysed by capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **35**:13–22.
- Barry GF, Rogers SG, Fraley RT, Brand L (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:4776–4780
- Bartrina I, Jensen H, Novák O, et al (2017) Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant Physiol* **173**:1783–1797.
- Bassil NV, Mok DWS, Mok MC (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* **102**:867–872
- Béres T, Gemrotová M, Tarkowski P, et al (2012) Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme in vitro reaction. *Anal Chim Acta* **751**:176–181.
- Blackwell JR, Horgan R (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* **295**:10–12.
- Brownlee BG, Hall RH, Whitty CD (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2 isopentenyl)adenine. *Can J Biochem* **53**:37–41
- Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, et al (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**:1051–1054
- Capra EJ, Laub MT (2012) The evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol* **66**:325–347.
- Carabelli M, Possenti M, Sessa G, et al (2007) Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes Dev* **21**:1863–1868.
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099–3108
- Chu H-M, Ko T-P, Wang AH-J (2010) Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Res* **38**:1738–1748.
- D'Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Phys* **124**:1706–1717.
- Daudu D, Allion E, Liesecke F, et al (2017) CHASE-containing histidine kinase receptors in apple tree: from a common receptor structure to divergent cytokinin binding properties and specific functions. *Front Plant Sci* **8**:1614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01614>
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, et al (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**:678–682.
- Dixon SC, Martin RC, Mok MC, et al (1989) Zeatin glycosylation enzymes in *Phaseolus*: Isolation of O-glucosyltransferase from *P. lunatus* and comparison to O-xylosyltransferase from *P. vulgaris*. *Plant Physiol* **90**:1316–1321.
- Entsch B, Letham DS (1979) Enzymic glucosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Sci Lett* **14**:205–212.
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, et al (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* **62**:2431–2452.
- Frébortová J, Fraaije MW, Galuszka P, et al (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem J* **380**:121–130.
- Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, et al (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot* **62**:2827–2840.
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, et al (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur J Biochem* **268**:450–461.
- Galuszka P, Spíchal L, Kopečný D, et al (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in Natural Products Chemistry* (Attar-Rahman), Elsevier, Amsterdam, NL, 203–264.
- Gan S, Amasino RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**:1986–1988.

- Gao R, Stock AM (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**:133–154.
- Hall RH, Csonka L, David H, McLennan B (1967) Cytokinins in the soluble RNA of plant tissues. *Science* **156**:69–71.
- Higuchi M, Pischke MS, Mähönen AP, et al (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:8821–8826.
- Hluska T, Šebela M, Lenobel R, et al (2017) Purification of maize nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase casts doubt on the existence of zeatin *cis-trans* isomerase in plants. *Front Plant Sci* **8**:1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01473>
- Horgan R, Hewett EW, Purse JG, Wareing PF (1973) A new cytokinin from *Populus × robusta*. *Tetrahedron Lett* **14**:2827–2828.
- Horgan R, Hewett EW, Horgan JM, et al (1975) A new cytokinin from *Populus × robusta*. *Phytochemistry* **14**:1005–1008.
- Hosoda K, Imamura A, Katoh E, et al (2002) Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *Plant Cell* **14**:2015–2029.
- Hothorn M, Dabi T, Chory J (2011) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat Chem Biol* **7**:766–768.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, et al (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**:3073–3087.
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**:383–389.
- Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, et al (1999) Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol* **40**:733–742
- Jaworek P, Kopečný D, Zalabák D, et al (2019a) Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta* **250**:229–244.
- Jaworek P, Tarkowski P, Hluska T, et al (2019b) Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins. *Planta*, přijato k publikování dne 13.10.2019
- Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**:677–685.
- Klämbt D, Thies G, Skoog F (1966) Isolation of cytokinins from *Corynebacterium fascians*. *Proc Natl Acad Sci USA* **56**:52–59.
- Kopečná M, Blaschke H, Kopečný D, et al (2013) Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine, and cytokinin ribosides. *Plant Physiol* **163**:1568–1583.
- Kopečný D, Končítiková R, Popelka H, et al (2016) Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. *FEBS J* **283**:361–377.
- Krall L, Raschke M, Zenk MH, Baron C (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett* **527**:315–318
- Kubiasová K, Mik V, Nisler J, et al (2018) Design, synthesis and perception of fluorescently labeled isoprenoid cytokinins. *Phytochemistry* **150**:1–11.
- Kuderová A, Gallová L, Kuricová K, et al (2015) Identification of AHK2- and AHK3-like cytokinin receptors in *Brassica napus* reveals two subfamilies of AHK2 orthologues. *J Exp Bot* **66**:339–353.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, et al (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**:652–655.
- Laplaze L, Benková E, Casimiro I, et al (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* **19**:3889–3900.
- Leibfried A, To JPC, Busch W, et al (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**:1172–1175.
- Letham DS (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci* **2**:569–573.
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MYu, et al (2015) Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J Exp Bot* **66**:1851–1863.
- Maaß H, Klämbt D (1981) On the biogenesis of cytokinins in roots of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **151**:353–358.



- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, et al (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* **14**:2938–2943.
- Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, et al (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**:94–98.
- Malito E, Coda A, Bilyeu KD, et al (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *J Mol Biol* **341**:1237–1249.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, et al (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**:805–815.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**:128–138
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, et al (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:16598–16603.
- Morris RO, Blevins DG, Dietrich JT, et al (1993) Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains. *Functional Plant Biol* **20**:621–637.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, et al (2010) The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* **20**:1138–1143.
- Müller B, Sheen J (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**:1094–1097.
- Murray JD, Karas BJ, Sato S, et al (2007) A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**:101–104.
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, et al (2008) Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:20032–20037.
- Novák O, Tarkowski P, Tarkowská D, et al (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **480**:207–218.
- Novák O, Hauserová E, Amakorová P, et al (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**:2214–2224.
- Persson BC, Esberg B, Ólafsson Ó, Björk GR (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* **76**:1152–1160.
- Pertry I, Václavíková K, Depuydt S, et al (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:929–934.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JA (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**:1541–1544.
- Romanov GA, Spíchal L, Lomin SN, et al (2005) A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Anal Biochem* **347**:129–134.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmuelling T (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J Exp Bot* **57**:4051–4058.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmuelling T (2018) Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytol* **218**:41–53.
- Sakai H, Honma T, Aoyama T, et al (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**:1519–1521.
- Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, et al (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:9972–9977.
- Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* **51**:660–672.
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, et al (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* **45**:1299–1305.
- Spíchal L (2011) Bacterial assay to study plant sensor histidine kinases. In: *Plant Kinases: Methods and Protocols* (Dissmeyer N, Schnittger A), Humana Press, Totowa, NJ, USA 139–147.
- Stirk WA, Václavíková K, Novák O, et al (2012) Involvement of *cis*-zeatin, dihydrozeatin, and aromatic cytokinins in germination and seedling establishment of maize, oats, and lucerne. *J Plant Growth Regul* **31**:392–405.
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, et al (2011) The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J* **67**:157–168.

- Strnad M, Peters W, Beck E, Kamínek M (1992) Immunodetection and identification of N<sup>6</sup>-(*o*-hydroxybenzylamino)purine as a naturally occurring cytokinin in *Populus × canadensis* Moench cv *Robusta* leaves. *Plant Physiol* **99**:74–80
- Strnad M, Peters W, Hanuš J, Beck E (1994) *Ortho*-topolin-9-glucoside, an aromatic cytokinin from *Populus × canadensis* cv *Robusta* leaves. *Phytochemistry* **37**:1059–1062.
- Strnad M (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* **101**:674–688.
- Strnad M, Hanus J., Vanek T., et al (1997) *Meta*-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus × canadensis* Moench., cv. *Robusta*). *Phytochemistry* **45**:213–218.
- Sun J, Niu Q-W, Tarkowski P, et al (2003) The *Arabidopsis* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol* **131**:167–176.
- Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, et al (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:2486–2489.
- Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, et al (2001) The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol* **42**:107–113.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol* **42**:85–93.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004) *Arabidopsis* *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. *J Biol Chem* **279**:41866–41872.
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, et al (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J* **45**:1028–1036.
- To JPC, Haberer G, Ferreira FJ, et al (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**:658–671.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, et al (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**:1596–1604.
- Ueguchi C, Koizumi H, Suzuki T, Mizuno T (2001) Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **42**:231–235.
- Wang C, Sang J, Wang J, et al (2013) Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. *PLOS Biology* **11**:e1001493. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001493>
- Werner T, Schmölling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **12**:527–538.
- West AH, Stock AM (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochem Sci* **26**:369–376.
- Whitty CD, Hall RH (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can J Biochem* **52**:789–799.
- Zhang K, Letham DS, John PCL (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200**:2–12.
- Žižková E, Dobrev PI, Muhovski Y, et al (2015) Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) SLIPT3 and SLIPT4 isopentenyltransferases mediate salt stress response in tomato. *BMC Plant Biology* **15**:85. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0415-7>
- Zubo YO, Blakley IC, Yamburenko MV, et al (2017) Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**:E5995–E6004.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BAP	benzyladenin (benzylaminopurin)
CKX	cytokinindehydrogenasa
<i>cZ(R)</i>	<i>cis</i> -zeatin(ribosid)
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
GFP	zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“)
HK	histidinkinasa
HMBPP	4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát
HPt	fosfotransferový protein
<i>iP(R)</i>	isopentenyladenin(ribosid)
IPT	isopentenyltransferasa
LOG	cytokininribosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa („Lonely guy“)
MES	2-(N morfolino)ethanesulfonová kyselina
MOPS	3-(N-morfolino)propanesulfonová kyselina
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
NBD	7-nitrobenzofurazan
NBT/BCIP	nitrotetrazoliová modř / 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
NRH	nukleosid- <i>N</i> -ribohydrolasa
<i>oT(R)</i>	<i>ortho</i> -topolin(ribosid)
Pc	<i>Populus</i> × <i>canadensis</i> (cv. <i>Robusta</i> )
RR	regulátor odpovědi („response regulator“)
TCS	system dvou komponent („two-component system“)
TDZ	thidiazuron
<i>tZ(R)</i>	<i>trans</i> -zeatin(ribosid)
VÚLHM	Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti
WT	rostlina divokého typu („wild type“)

## 8 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE

### Publikace relevantní pro disertační práci

**Jaworek P**, Kopečný D, Zalabák D, Šebela M, Kouřil Š, Hluska T, Končítíková R, Podlešáková K, Tarkowski P (2019) Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta* 250:229–244. **IF** = 3.06

**Jaworek P**, Tarkowski P, Hluska T, Kouřil Š, Nisler J, Kopečný D (2019) Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins. *Planta*, přijato k publikování dne 13.10.2019 **IF** = 3.06

### Další spoluautorské publikace

Šmehilová M, Galuszka P, Bilyeu KD, **Jaworek P**, Kowalska M, Šebela M, Sedlářová M, English JT, Frébort I (2009) Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *J Exp Bot* 60, 2701–2712. **IF** = 5.36

Mortier V, Wasson A, **Jaworek P**, De Keyser A, Decroos M, Holsters M, Tarkowski P, Mathesius U, Goormachtig S (2014) Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytol* 202:582–593. **IF** = 7.30

Motte H, Galuszka P, Spíchal L, Tarkowski P, Plíhal O, Šmehilová M, **Jaworek P**, Vereecke D, Werbrouck S, Geelen D (2013) Phenyl-adenine, identified in a LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS4-assisted chemical screen, is a potent compound for shoot regeneration through the inhibition of CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE Activity. *Plant Physiol* 161:1229–1241. **IF** = 6.31

Tarkowski P, Floková K, Václavíková K, **Jaworek P**, Raus M, Nordström A, Novák O, Doležal K, Šebela M, Frébortová J (2010) An improved in vivo deuterium labeling method for measuring the biosynthetic rate of CKs. *Molecules* 15:9214–9229. **IF** = 3.06